

Biochemie von Enzymen
des anaeroben Stoffwechsels von Toluol in
Thauera aromatica

Von dem Fachbereich Biologie der Technischen Universität Darmstadt

zur

Erlangung des akademischen Grades eines Doctor rerum naturalium

genehmigte Dissertation

von

Diplom-Biologin Marie-Luise Lippert
aus Groß-Umstadt

Berichterstatter (1. Referent): Prof. Dr. Johann Heider

Mitberichterstatter (2. Referent): Prof. Dr. Felicitas Pfeifer

Tag der Einreichung: 28.01.2009

Tag der mündlichen Prüfung: 03.04.2009

Darmstadt 2009

D 17

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden von Juli 2005 bis August 2008 am Institut für Mikrobiologie und Genetik des Fachbereiches Biologie der Technischen Universität Darmstadt unter der Leitung von Prof. Dr. Johann Heider durchgeführt.

Inhaltsverzeichnis

I. Zusammenfassung.....	1
II. Einleitung.....	3
III. Material und Methoden.....	13
1. Materialien.....	13
1.1 Chemikalien	13
1.2 Biochemikalien	13
1.3 Gase	13
1.4 Chromatographiematerial	13
2. Stämme, Plasmide und synthetische Oligonukleotide.....	14
3. Medien und Puffer.....	16
3.1 Medien für die Kultivierung von <i>E. coli</i>	16
3.2 Medien für die Kultivierung von <i>T. aromatica</i> Stamm K172	17
3.3 Medien für die Kultivierung von <i>Azoarcus</i> sp. Stamm T	18
4. Kultivierung von Bakterien und Herstellung von Zellextrakten.....	19
4.1 Kultivierung von <i>E. coli</i>	19
4.2 Kultivierung von <i>T. aromatica</i> und <i>Azoarcus</i> sp. Stamm T	20
4.3 Zellernte unter aeroben und anaeroben Bedingungen	20
4.4 Präparation von Zellextrakten unter aeroben und anaeroben Bedingungen	21
4.5 Stammkulturhaltung	22
5. Molekularbiologische und Genetische Methoden.....	23
5.1 Isolierung genomischer DNA	23
5.2 Isolierung von Plasmid-DNA	24
5.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	24
5.4 DNA-Fällung	26
5.5 Elektrophoretische Auftrennung von DNA	26
5.6 Isolierung von DNA aus Agarosegelen	26
5.7 Klonierungstechniken	27
5.8 Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	27
5.9 Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	28
5.10 Konstruktion von Plasmiden	28
5.11 Sequenzanalyse	29

6. Biochemische Methoden.....	29
6.1 <i>In vivo</i> -Überexpression Plasmidkodierter Gene in <i>E. coli</i>	29
6.2 Reinigung von Enzymen	31
6.2.1 Reinigung der (<i>E</i>)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase	31
6.2.2 Reinigung der 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA Dehydrogenase	32
6.2.3 Reinigung der Benzoylsuccinyl-CoA-Thiolase	33
6.2.4 Reinigung der (<i>R</i>)-Benzylsuccinat-Synthase	34
6.3 Konzentrierung von Proteinlösungen	34
6.4 Proteinbestimmung	34
6.5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	35
6.6 Immunoblot	36
6.7 Enzymatische Tests	37
6.7.1 Enzymtest zur Aktivitätsbestimmung der (<i>E</i>)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase	37
6.7.2 Enzymtest zur Aktivitätsbestimmung der 2-(Hydroxymethylphenyl)- Succinyl-CoA Dehydrogenase	37
6.7.3 Enzymtest zur Aktivitätsbestimmung der 2-(Hydroxymethylphenyl)- Succinyl-CoA Dehydrogenase mit alternativen Substraten	38
6.7.4 Enzymtest zur Aktivitätsbestimmung der Benzoylsuccinyl-CoA- Thiolase	39
6.7.5 Produkt-Analyse über RP-HPLC	39
6.7.6 Enzymtests zur Bestimmung der Aktivierbarkeit rekombinanter (<i>R</i>)-Benzylsuccinat-Synthase	40
6.7.7 Enzymtest zur Aktivitätsbestimmung der (<i>R</i>)-Benzylsuccinat- Synthase in Rohextrakten von <i>T. aromatica</i> und <i>Azoarcus</i> sp. Stamm T	41
6.8 Methoden zur Enzymkinetik	41
6.8.1 Bestimmung von apparenten K_m -Werten und V_{max}	41
6.9 Methoden zur Bestimmung apparenter Molekülmassen	42
6.9.1 Gelfiltration	42
6.9.2 Native Polyacrylamidgele und Ferguson-Analyse	43
7. Chemische Arbeitsmethoden.....	44
7.1 Synthese von (<i>E</i>)-Phenylitaconat	44
7.2 Synthese von CoA-Thioestern	45
7.3 Synthese von (<i>E</i>)-Phenylitaconyl- <i>N</i> -Acetylcysteamin	46
8. Analytische Methoden.....	46
8.1 Reversed-phase Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (RP-HPLC)	46
8.2 Nachweis freier Thiolgruppen	48
8.3 Nachweis von Zink	48
9. Spektroskopische Methoden.....	49
9.1 UV/Vis-Spektroskopie	49
9.2 Massenspektroskopische Methoden	49

IV. Ergebnisse.....	50
1. Enzyme der β-Oxidation von (<i>R</i>)-Benzylsuccinat.....	50
1.1 Reinigung und Charakterisierung der (<i>E</i>)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase.....	51
1.1.1 Chemische Synthese von (<i>E</i>)-Phenylitaconyl-CoA	51
1.1.2 Überproduktion und Reinigung der (<i>E</i>)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase	54
1.1.3 Photometrischer Test zum Nachweis der Enzymaktivität der (<i>E</i>)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase	56
1.1.4 Produktnachweis über RP-HPLC	57
1.1.5 Biochemische Charakterisierung der (<i>E</i>)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase	59
1.2 (<i>E</i>)-Phenylitaconyl-<i>N</i>-Acetylcysteamin als alternatives Substrat der (<i>E</i>)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase.....	62
1.2.1 Chemische Synthese von (<i>E</i>)-Phenylitaconyl- <i>N</i> -Acetylcysteamin	62
1.2.2 Stabilität von (<i>E</i>)-Phenylitaconyl- <i>N</i> -Acetylcysteamin bei verschiedenen pH-Werten	62
1.2.3 Aktivität der (<i>E</i>)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase mit (<i>E</i>)-Phenylitaconyl- <i>N</i> -Acetylcysteamin als Substrat	64
1.3 Reinigung und Charakterisierung der 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA Dehydrogenase.....	66
1.3.1 Überproduktion und Reinigung der 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA Dehydrogenase	66
1.3.2 Photometrischer Test zum Nachweis der Enzymaktivität der 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA Dehydrogenase	68
1.3.3 Produktnachweis über RP-HPLC	70
1.3.4 Biochemische Charakterisierung der 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA Dehydrogenase	72
1.4 Alternative Substrate der 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA Dehydrogenase.....	76
1.5 Reinigung und Charakterisierung der Benzoylsuccinyl-CoA-Thiolase.....	78
1.5.1 Überproduktion und Reinigung der Benzoylsuccinyl-CoA-Thiolase	78
1.5.2 Produktnachweis über RP-HPLC.	81
1.5.3 Photometrischer Test zum Nachweis der Enzymaktivität der Benzoylsuccinyl-CoA-Thiolase	83
1.5.4 Biochemische Charakterisierung der Benzoylsuccinyl-CoA-Thiolase	85

2. Untersuchungen zur (R)-Benzylsuccinat-Synthase.....	90
2.1 Charakterisierung der rekombinanten (R)-Benzylsuccinat-Synthase.....	90
2.1.1 Überproduktion und Reinigung	90
2.1.2 Aktivierungsversuche der rekombinanten (R)-Benzylsuccinat-Synthase	91
2.2 Klonierung der (R)-Benzylsuccinat-Synthase aus <i>Geobacter metallireducens</i>.....	94
2.3 Die (R)-Benzylsuccinat-Synthase aus <i>T. aromatica</i> bzw. <i>Azoarcus</i> sp. Stamm T.....	96
2.3.1 Zellanzucht und Herstellung von Zellextrakten	96
2.3.2 Produktnachweis über RP-HPLC	97
2.3.3 Substratspektrum der (R)-Benzylsuccinat-Synthase	99
2.4 Das aktivierende Enzym.....	102
2.4.1 Überproduktion des aktivierenden Enzyms in <i>E. coli</i> und Herstellung von Zellextrakten	102
2.5 Weitere Genprodukte des <i>bss</i>-Operons.....	104
2.5.1 Überproduktion von BssE in <i>E. coli</i>	104
2.5.2 Überproduktion von BssG aus <i>Aromatoleum aromaticum</i> Stamm EbN1 in <i>E. coli</i>	105
2.5.3 Klonierung von <i>bssF</i> aus <i>T. aromatica</i>	106
V. Diskussion.....	109
1. Enzyme der β-Oxidation von (R)-Benzylsuccinat.....	109
1.1 Die (E)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase	109
1.2 Die 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA Dehydrogenase	114
1.3 Die Benzoylsuccinyl-CoA-Thiolase	118
2. Die (R)-Benzylsuccinat-Synthase.....	125
2.1 Die (R)-Benzylsuccinat-Synthase als Glycylradikal-Enzym	125
2.2 Aktivierung der (R)-Benzylsuccinat-Synthase	128
2.3 Das aktivierende Enzym	129
2.4 Funktion weiterer Gene im <i>bss</i> -Operon	130
VI. Literaturverzeichnis.....	133

VII. Abkürzungsverzeichnis.....	147
VIII. Anhang.....	149
Danksagung.....	160
Eidesstattliche Erklärung.....	161
Lebenslauf.....	162

I. Zusammenfassung

Toluol wird unter anaeroben Bedingungen durch das denitrifizierende Betaproteobakterium *T. aromatica* abgebaut. Die initiale Reaktion des Stoffwechsels ist die Addition der Methylgruppe von Toluol an die Doppelbindung von Fumarat. Dieser Schritt, bei dem (*R*)-Benzylsuccinat entsteht, wird durch die (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase katalysiert. Dieses Enzym gehört zur Familie der Glycylradikal-Enzyme und wird erst posttranslational durch ein aktivierendes Enzym zur aktiven, Glycylradikal-haltigen Form umgesetzt. (*R*)-Benzylsuccinat wird anschließend über eine β -Oxidations-ähnliche Kaskade von Enzymen zu Benzoyl-CoA und Succinyl-CoA umgesetzt. Benzoyl-CoA ist ein zentrales Intermediat des anaeroben Stoffwechsels, dessen weiterer Abbauweg bereits gut bekannt ist. Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung der letzten drei Enzyme dieses Weges, welche die Umsetzung von (*E*)-Phenylitaconyl-CoA zu Benzoyl-CoA und Succinyl-CoA katalysieren. Des Weiteren wurde die Aktivierbarkeit der rekombinanten (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase durch das aktivierende Enzym überprüft.

1. Die (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase wurde heterolog in *E. coli* überproduziert, gereinigt und charakterisiert. Es handelt sich um ein Homotetramer aus 29 kDa-Untereinheiten und das Produkt der Reaktion wurde über HPLC-MS als 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA identifiziert. Das Enzym zeigt eine kooperative Kinetik mit einem Hill-Koeffizienten von $N=4$, einem apparenten K_m -Wert von $109 \pm 7 \mu\text{M}$ und V_{max} von $32 \pm 3 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$. Des Weiteren unterliegt das Enzym einer Substratinhibition (K_{is} : $234 \pm 12 \mu\text{M}$). Mit einem alternativen Substrat, das statt mit CoA durch *N*-Acetylcysteamin aktiviert war, wurden vergleichbare enzymkinetische Parameter erhalten.
2. Die 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA-Dehydrogenase wurde in *E. coli* überproduziert, gereinigt und näher charakterisiert. In einem gekoppelten Enzymtest folgt das heterodimere Enzym einer Michaelis-Menten-Kinetik mit einem apparenten K_m -Wert von $84 \pm 8 \mu\text{M}$ und einem V_{max} von $1,2 \pm 0,1 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$. Das Produkt der Reaktion wurde über RP-HPLC detektiert und die im Produkt vorhandene Ketogruppe durch Bildung eines Hydrazons nachgewiesen. In der Rückreaktion reduziert das Enzym Halogen-substituierte Acetophenone mit einer kooperativen Kinetik.

3. Die Thiolase-Untereinheit BbsB wurde zusammen mit dem konservierten BbsA-Protein in *E. coli* überproduziert. Die beiden Proteine wurden während der Reinigung getrennt und separat charakterisiert. BbsB und BbsA bilden jeweils ein Homodimer aus 41 kDa- bzw. 16 kDa-Untereinheiten, das BbsA-Protein enthält zudem ein Zink-Ion pro Untereinheit, welches vermutlich über ein konserviertes Zinkfinger-Motiv der Sequenz gebunden ist. Die erwartete Aktivität der Thiolase wurde über RP-HPLC in Form der Rückreaktion als Kondensation von Succinyl-CoA und Benzoyl-CoA gemessen und war strikt abhängig von der Anwesenheit beider Proteine BbsA und BbsB. Die Ketogruppe im Reaktionsprodukt wurde durch Derivatisierung mit Phenylhydrazin nachgewiesen, und über einen photometrischen Enzymtest wurde der Reaktionsmechanismus der Benzoylsuccinyl-CoA-Thiolase als Ping-Pong-Kinetik mit den folgenden Parametern bestimmt: apparente K_m -Werte von $155 \pm 12 \mu\text{M}$ für Benzoyl-CoA bzw. $190 \pm 6 \mu\text{M}$ für Succinyl-CoA und ein V_{max} -Wert von $11 \pm 2 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$.
4. Durch Optimierung der Anzucht- und Aufarbeitungsbedingungen von *T. aromatica* bzw. *Azoarcus* sp. Stamm T wurden Rohextrakte mit spezifischen Aktivitäten beider (R)-Benzylsuccinat-Synthasen von $18 \pm 2 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$ bzw. $9 \pm 1,6 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$ erhalten. In Rohextrakten beider Stämme wurde zusätzlich die Umsetzung eines weiteren Substratanalogs (*o*-Toluidin) nachgewiesen, das mit 9-13 % der Rate der Toluol-Umsetzung zum Succinataddukt umgesetzt wurde.
5. Das aktivierende Enzym wurde als Fusionsprotein in *E. coli* überproduziert und lag zu 10 % in löslicher Form vor. Aktivierungsversuche mit gereinigter rekombinanter (R)-Benzylsuccinat-Synthase durch Zellextrakte mit überproduziertem aktivierendem Enzym und zugesetzten inaktivierten Rohextrakten von *T. aromatica* bzw. *Azoarcus* sp. Stamm T lieferten allerdings weder über Messung produzierten (R)-Benzylsuccinats noch über Western-Blot-Analyse der radikaltragenden Untereinheit Hinweise für die erwartete Glycyl-Radikal-Bildung. Die Gene *bssCAB*, die für die (R)-Benzylsuccinat-Synthase in *G. metallireducens* kodieren, wurden in einen Überexpressionsvektor kloniert. Jedoch wurde keine Überproduktion des Proteins in *E. coli* beobachtet.
6. Die vermuteten akzessorischen Genprodukte BssE, BssF und BssG wurden in *E. coli* überproduziert, liegen aber fast ausschließlich in Form von Einschlusskörperchen vor.

II. Einleitung

Aromatische Verbindungen sind nach den Kohlehydraten die mengenmäßig wichtigste Stoffklasse der belebten Natur. Quellen für diese Verbindungen sind das pflanzliche Lignin, in dem etwa ein viertel des organischen Kohlenstoffs fixiert ist. Weiter tragen eine Reihe essentieller Aminosäuren wie Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan aromatische Reste. Aromaten sind auch in vielen sekundären Pflanzenstoffen, Xenobiotika und fossilen Brennstoffen, wie Erdöl und Kohle, enthalten.

Seit der Entstehung von Erdöl gelangt dieses über gekennzeichnete Stellen, z. B. Pechseen und Teersände in Kanada oder im Iran, an die Bodenoberfläche oder in das Wasser (Wenger und Isaksen, 2002). Mit Beginn der industriellen Gewinnung von Kohlenwasserstoffen aus Erdöl um 1859, zunächst als Lösungs- oder Schmiermittel oder als Brennstoff für Petroleumlampen, gelangen diese verstärkt in die Umwelt. Diese Mineralölkohlenwasserstoffe (aliphatische und aromatische Kohlenwasserstoffe) bilden aufgrund der großen Mengen die gefördert, gelagert, transportiert und umgeschlagen werden, die bedeutendste Gruppe von Schadstoffen in unserer Umwelt. Probleme treten vor allem beim Transport über Pipelines bzw. Öltanker, in Abfüllanlagen oder durch sonstige Leckagen oder Unfälle auf. Umweltbelastungen durch diese chemisch stabilen Kohlenwasserstoffe sind toxikologisch und ökologisch bedenklich. Besonders ihre hohe Persistenz stellt ein großes Problem für ihren Abbau dar. Obwohl innerhalb der letzten 20 Jahre vielfältige Entwicklungen auf dem Gebiet der Bodensanierung gemacht worden sind, stößt man z.B. bei schadstoffbelasteten Böden immer noch auf Schwierigkeiten.

In den letzten Jahren gewinnt die sogenannte Bioremediation, der Einsatz von Mikroorganismen, Pilzen, Pflanzen oder deren Enzyme zur Beseitigung von Schadstoffen wie Kohlenwasserstoffen, immer mehr an Bedeutung (Wackett et al., 2000). Oft gelangen diese Kohlenwasserstoffe auch in anoxische Zonen des Erdreichs, so dass dem erst kürzlich nachgewiesenen anaeroben Abbau von Kohlenwasserstoffen eine große Bedeutung für biologische Sanierungsaufgaben zukommt (Rabus und Widdel, 1995). Die Steuerung solcher biologischer Abbauprozesse setzt jedoch genaue Kenntnisse der Eigenschaften und Fähigkeiten der beteiligten Mikroorganismen, deren metabolischen Netzwerken sowie zellulären Anpassungsmechanismen voraus. Daher werden in den letzten Jahren Anstrengungen unternommen, ungewöhnliche metabolische Reaktionen und Enzyme aus

degradativen Mikroorganismen zu charakterisieren und zu gewinnen, die für eine biotechnologische Anwendung von Relevanz sind (Wackett et al., 2000).

Eigenschaften von Kohlenwasserstoffen

Kohlenwasserstoffe werden in drei Klassen eingeteilt: Aliphaten wie *n*-Hexan sind lineare oder verzweigte Kohlenwasserstoffe und können Doppel- oder Dreifachbindungen enthalten. Alicyclen (z.B. Cyclohexan) enthalten ringförmig angeordnete Kohlenstoffatome, die aber keine oder nicht vollständig konjugierte Doppelbindungen enthalten und sich dadurch von den aromatischen Kohlenwasserstoffen (z.B. Benzol) unterscheiden, die Ringsysteme mit einem „Aromatischen“ delokalisierten π -Elektronensystem enthalten.

Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Alkylbenzol Toluol ist der aromatische Ring mit einer Methylgruppe substituiert. Toluol wird zusammen mit Benzol, Ethylbenzol und den drei Dimethylbenzol-Isomeren (*ortho*-, *meta*- und *para*-Xylol) zur ökonomisch und ökologisch wichtigen Gruppe der BTEX-Kohlenwasserstoffe zusammengefasst (Abb. 1). Diese Stoffe werden aus Erdöl oder Steinkohle gewonnen und dienen bei vielen industriellen Verfahren als Lösungsmittel. Außerdem sind sie Ausgangsprodukte für die Herstellung vieler chemischer Produkte wie z. B. Arzneimittel, Agrochemikalien und Plastik. Einige dieser Verbindungen entstehen aber auch auf natürliche Weise in anoxischen Umgebungen. Zum Beispiel wird Toluol unter Sauerstoffausschluss aus Ligninverbindungen oder in Gärungswegen einiger gram-positiver Clostridien und des fakultativ anaeroben Bakteriums *Tolumonas auensis* durch Decarboxylierung von Phenylacetat gebildet (Jüttner et al. 1986; Vogel und Grbic-Galic,

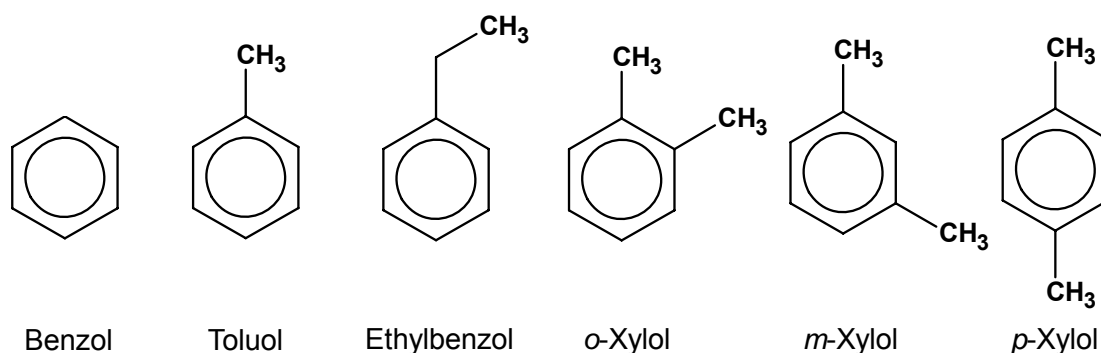


Abb. 1: Gruppe der BTEX. Die aromatischen Kohlenwasserstoffe mit der größten technischen Bedeutung in der Industrie werden in der sogenannten BTEX-Gruppe zusammengefasst, wobei die Abkürzung BTEX für die Substanzen Benzol, Toluol, Ethylbenzol und die drei Xylol-Isomere steht.

Galic, 1986). BTEX-Stoffe schädigen nicht nur die Umwelt, sondern wirken auch toxisch auf den menschlichen Organismus und Benzol wird als krebserregende Substanz eingestuft (U.S. Public Health Service, 1989). Die Aromaten werden über die Haut und Atemwege aufgenommen und durch ihren lipophilen Charakter im Fettgewebe angereichert. Sie verursachen Nerven-, Nieren-, Blutbildungs- und möglicherweise auch Leberschäden.

Aerober Abbau von Toluol

Die Fähigkeit, Toluol unter aeroben Bedingungen als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle zu verwenden, ist unter Bakterien und Pilzen weit verbreitet (Gottschalk, 1998; Madigan et al., 1997; Schlegel und Zaborosch, 1992; Zylstra und Gibson, 1991). Entscheidend für diese katabole Leistung ist die Nutzung von hoch reaktiven Sauerstoffspezies (aus O_2) als Kosubstrate für Mono- und Dioxygenasen zur initialen Aktivierung dieses reaktionsträgen Substrates (Harayama et al., 1992; Dagley, 1984; Gibson und Subramanian, 1984). Dabei werden ein oder zwei Sauerstoffatome aus molekularem Sauerstoff der Luft in Form von Hydroxygruppen in das Substrat eingeführt, wodurch der aromatische Ring leichter angreifbar, eine Ringspaltung und der weitere Abbau möglich ist (Harwood und Parales, 1996).

Anaerober Abbau von Toluol

Vor etwa 22 Jahren wurde erstmals nachgewiesen, dass Toluol und einige andere Kohlenwasserstoffe auch in Abwesenheit von molekularem Sauerstoff von Bakterien abgebaut werden (Vogel und Grbic-Galic, 1986; Zeyer et al., 1986). Inzwischen sind viele anaerobe Toluolabbauende Bakteriengattungen bekannt, die phylogenetisch keiner einheitlichen Gruppe zugehören. Nach ihren Stoffwechsel-Typen werden sie in denitrifizierende, Eisen(III)-reduzierende, Sulfat-reduzierende, Protonen-reduzierende und phototrophe Bakterien unterteilt. Die meisten isolierten Organismen bauen Toluol unter denitrifizierenden Bedingungen ab und gehören zu den β -Proteobakterien. Zu ihnen gehören die Gattungen *Thauera* und *Azoarcus* bzw. „*Aromatoleum*“, die häufig in der Natur im Boden vorkommen. Bekannte Stämme dieser Gattungen, die in unserem Labor als Untersuchungsobjekt dienen, sind *T. aromatica* Stamm K172 (Anders et al., 1995) und

„*Aromatoleum aromaticum*“ Stamm EbN1 (Rabus und Widdel, 1995). Neben den nitratreduzierenden Gattungen sind Vertreter aus der Gruppe der δ -Proteobakterien gefunden worden, die Sulfat (Beller et al., 1996; Rabus und Widdel, 1995) oder Eisen(III) (Lovley und Lonergan, 1990) als terminalen Elektronenakzeptor verwenden. Die sulfatreduzierende Gattung *Desulfobacula* oxidiert zum Beispiel verschiedene aromatische Verbindungen zu CO_2 , einschließlich Toluol. Ihr natürliches Habitat sind marine Sedimente. *Geobacter metallireducens* ist ein bekannter Vertreter der Eisen(III)-reduzierenden Bakterien, der auch Toluol als Elektronendonator verwenden kann. Dies könnte für den Umweltschutz eine Rolle spielen, da häufig eisenreiche Gewässersedimente mit Toluol verschmutzt sind und hier der Organismus zur Dekontamination eingesetzt werden könnte. Außer den Toluol-abbauenden Bakteriengattungen, die ihre Energie über Elektronentransport und Atmung gewinnen, wurden Organismen gefunden, die Aromaten zu CO_2 und Wasserstoff vergären können. Sie wachsen allerdings nur in Kokultur mit sulfatreduzierenden Bakterien oder methanogenen Archaea, welche die Wasserstoff-Konzentrationen niedrig halten (Cherge et al., 2006; Vogel und Grbic-Galic, 1986). Neben den genannten chemotrophen Organismen sind auch phototrophe Bakterien entdeckt worden, die aromatische Verbindungen abbauen können. So bezieht *Blastochloris sulfovirens* zum Beispiel seine Energie aus dem Sonnenlicht und verwendet Toluol als Kohlenstoff- und Elektronenquelle (Zengler et al., 1999).

Stoffwechselweg des anaeroben Toluolabbaus: die (R)-Benzylsuccinat-Synthase

Alle bekannten Organismen, die Toluol unter anaeroben Bedingungen abbauen, initiieren diesen Stoffwechselweg durch eine stereospezifische Addition der Methylgruppe des Toluols an die Doppelbindung eines Fumarat-Kosubstrates, wobei (R)-Benzylsuccinat entsteht (Beller und Spormann, 1999; Leuthner et al., 1998). Diese Reaktion stellt ein neues biochemisches Prinzip dar und wird durch ein Glycyl-Radikalenzym, die (R)-Benzylsuccinat-Synthase, katalysiert. In den letzten Jahren ist dieses Enzym aus *T. aromatica* zu einem Modell für Enzyme geworden, die analoge Fumarat-Additionsreaktionen katalysieren. Die Familie der Glycyl-Radikalenzyme wächst stetig und lässt sich aufgrund ihrer strukturellen Eigenschaften in acht Gruppen einteilen, von denen fünf Vertreter mit bekannten Funktionen aufweisen (Selmer et al., 2005). Diese fünf Gruppen sind (1) die Pyruvat-Formiat-Lyasen (Becker et al., 1999; Knappe et al., 1984), (2) die anaeroben Ribonukleotid-Reduktasen (Sawers und

Watson, 1998), (3) die (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase und verwandte Enzyme (Beller und Spormann, 1999; Coshigano et al., 1998; Leuthner et al., 1998), (4) die *p*-Hydroxy-Phenylacetat-Decarboxylase aus *Clostridium difficile* und verwandte Enzyme (Selmer und Andrei, 2001) und (5) die Coenzym B₁₂-unabhängigen Glycerin Dehydratasen (Raynaud et al., 2003). Mit Ausnahme der *p*-Hydroxy-Phenylacetat-Decarboxylase und der (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase bestehen alle Glycyl-Radikalenzyme nur aus einer Untereinheit, die bei allen Vertretern der Familie konserviert ist. Zusätzlich zu dieser konservierten Glycylradikal-haltigen Untereinheit enthält die *p*-Hydroxy-Phenylacetat-Decarboxylase eine weitere kleine Untereinheit, während die Vertreter der (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase-Familie als einzige Gruppe sogar zwei kleine zusätzliche Untereinheiten besitzen.

Die drei Untereinheiten der (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase aus *T. aromatica* werden durch die Gene *bssCAB* im *bss*-Operon kodiert (siehe Abb. 3, B) und das Enzym wurde bereits gereinigt und näher charakterisiert (Leuthner et al., 1998). Die (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase ist im Zytoplasma lokalisiert, hat eine apparente Molekülmasse von 220 kDa und besteht aus drei verschiedenen Untereinheiten, die vermutlich ein Hexamer der Zusammensetzung $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ bilden (Leuthner et al., 1998). Die Massen der Untereinheiten wurden von Leuthner et al. (1998) zu 98 kDa (α), 8,5 kDa (β) und 6,4 kDa (γ) bestimmt.

Wie die anderen Glycyl-Radikalenzyme benötigt auch die (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase ein sogenanntes aktivierendes Enzym, welches das Radikal posttranslational in die α -Polypeptidkette einführt und somit das Enzym in den aktiven Zustand überführt. Das aktivierende Enzym der (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase wird durch *bssD*, das erste Gen im *bss*-Operon, kodiert (siehe Abb. 3, B; Leuthner et al., 1998). Alle bekannten aktivierenden Enzyme für Glycyl-Radikalenzyme benötigen *S*-Adenosylmethionin, welches jedoch nicht als Methylgruppendonator dient, sondern als „Radikaldonor“ die Bildung des Glycylradikals initiiert. Sie besitzen ein konserviertes Motiv mit drei Cystein-Resten, welches einen [Fe₄S₄]-Cluster bindet. Die vierte Koordinationsstelle des Clusters ist dabei kein Cystein des Proteins, sondern das Kosubstrat *S*-Adenosylmethionin, das direkt an den [Fe₄S₄]-Cluster bindet (Krebs et al., 2002). Aktivierte (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase zeigt ein für Glycyl-Radikalenzyme charakteristisches Verhalten: Durch Inkubation mit Luftsauerstoff wird die aktivierte α -Untereinheit am Glycylradikal oxygenolytisch gespalten, wodurch eine um 4 kDa verkürzte α' -Untereinheit entsteht. Da jeweils nur eine α -Untereinheit pro Holoenzym aktiviert ist, erkennt man auf dem SDS-Gel eine für Glycyl-Radikalenzyme charakteristische Doppelbande

(Wagner et al., 1991). Überraschenderweise wird die (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase auch durch Inkubation mit NO, CO und Cyanid inhibiert, die bisher nicht als Inhibitoren für Glycylradikal-Enzyme bekannt waren (Verfürth et al., 2004). Mit Hilfe von ESR-Analysen konnte gezeigt werden, dass das Glycylradikal des aktivierten Enzyms durch O₂ zerstört wird, durch die anderen drei Inhibitoren allerdings nur wenig oder gar nicht beeinflusst wird (Verfürth et al., 2004). Im Gegensatz zu anderen Glycyl-Radikalenzymen enthält die (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase zwei [Fe₃S₄]-Zentren, die über UV/Vis- und EPR-Spektroskopie in der heterolog produzierten, jedoch inaktiven (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase identifiziert und näher charakterisiert wurden (C. Feil, 2006). Des Weiteren wurde durch Elementaranalysen gezeigt, dass das rekombinante Enzym sechs Eisenatome pro Holoenzym besitzt (C. Feil, 2005). ESR-Analysen nach Behandlung des rekombinanten Enzyms mit den Inhibitoren CO, NO und Cyanid weisen darauf hin, dass diese Inhibitoren die Funktion des Enzyms wahrscheinlich durch Interaktion mit den [Fe₃-S₄]-Zentren beeinträchtigen (C. Feil 2006, J. Hogg, 2008). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde ein modifizierter Reaktionsmechanismus für die (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase vorgeschlagen (Abb. 2). Das radikalische Zentrum der (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase abstrahiert ein Wasserstoffatom der Methylgruppe des Toluols. Anschließend addiert das entstandene Benzylradikal an die Doppelbindung des Fumarat-Kosubstrates. Anschließend re-abstrahiert das (*R*)-Benzylradikal ein Wasserstoffatom des aktiven Zentrums der (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase, wodurch das Produkt (*R*)-Benzylsuccinat entsteht. Dadurch wird die (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase wieder in den radikalischen Zustand überführt und steht für einen weiteren Reaktionszyklus bereit (C. Feil, 2006; J. Hogg, 2008).

Das *bss*-Operon enthält stromabwärts von *bssB* bis zu vier weitere Gene (*bssEFGH*), die kotranskribiert werden und deren Produkte teilweise als Toluol-induzierte Proteine nachgewiesen wurden (siehe Abb. 3, B; Leuthner und Heider, 1998). Ihre Funktion ist allerdings bis heute unbekannt. Das *bssE*-Gen kodiert für ein Protein mit hoher Sequenzähnlichkeit zu einer Klasse von ATP-bindenden Proteinen (NirQ, NorQ, CbbQ, RbcX), die für die Aktivität der Stickstoffmonoxid-Reduktase bzw. der Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase notwendig sind (Saschenbrecker et al., 2007; Igarashi et al., 1999; Neuwald et al., 1999). Orthologe der folgenden Gene *bssFG* werden in den *bss*-Operons weiterer Toluolabbauender Stämme gefunden, jedoch konnte beiden Genprodukten bisher keine Funktion zugeordnet werden (Kube et al., 2004). Das *bssH*-Gen kodiert für ein membranständiges Transport-Protein (Kube et al., 2004). Da Toluol membrangängig ist, könnte es sich um ein Efflux-System handeln, das toxische Toluol-Konzentrationen entgiftet (Kube et al., 2004).

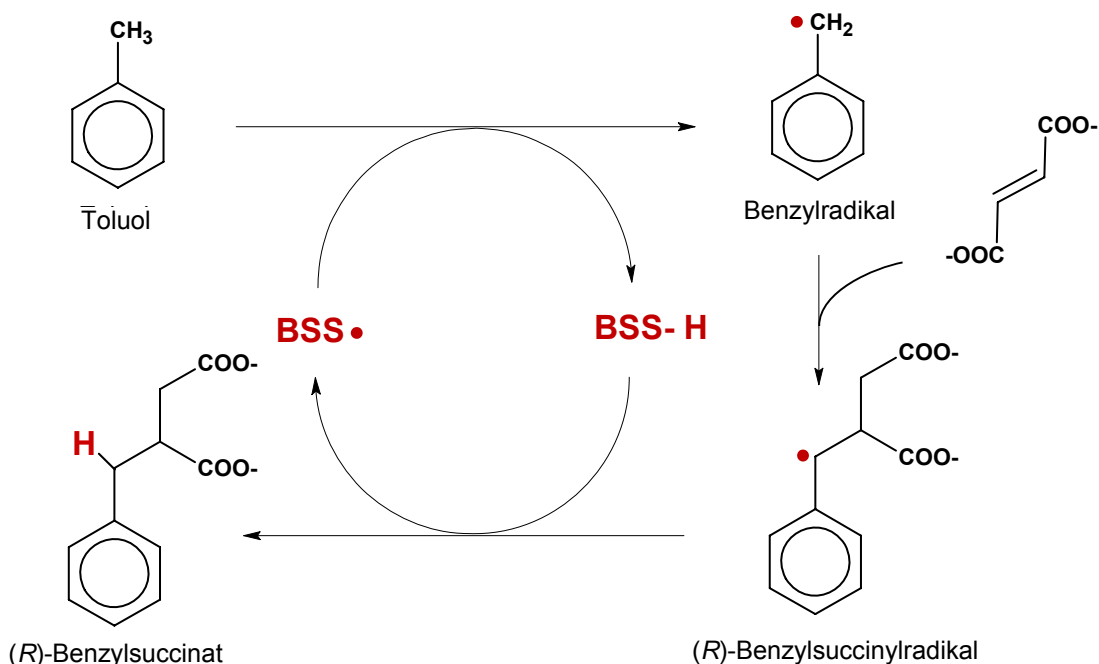


Abb. 2: Modell des Reaktionsmechanismus der (R)-Benzylsuccinat-Synthese. Das radikalische Zentrum abstrahiert ein Wasserstoff-Atom von der Methylgruppe des Toluols und bildet ein Benzylradikal. Dieses addiert an die Doppelbindung eines gebundenen Fumarat-Kosubstrates. Das gebildete (R)-Benzylsuccinylradikal re-abstrahiert das Wasserstoffatom unter Produktbildung und stellt den ursprünglichen aktiven Zustand der (R)-Benzylsuccinat-Synthase wieder her.

β -Oxidation von (R)-Benzylsuccinat

Das zentrale Intermediat im anaeroben Stoffwechsel diverser aromatischer Verbindungen ist Benzoyl-CoA (Harwood et al., 1999). Entsprechend wurde Benzoat in vielen anaeroben Toluol-abbauenden Kulturen als vorübergehend ausgeschiedenes Produkt detektiert (Chee-Sanford et al., 1996; Beller et al., 1992; Evans et al., 1992; Altenschmidt et al., 1991). Biegert et al. (1996) zeigten, dass (R)-Benzylsuccinat weiter zu Benzoyl-CoA oxidiert wird. Es wurde angenommen, dass eine Aktivierung von (R)-Benzylsuccinat zum entsprechenden CoA-Thioester stattfindet und dieser anschließend über eine modifizierte β -Oxidation zu Benzoyl-CoA oxidiert wird (siehe Abb. 3, A). Die Gene aller daran beteiligten Enzyme liegen vermutlich im *bbs*- (für β -Oxidation von Benzylsuccinat) Operon (siehe Abb. 3, B).

Die Enzyme, welche an den ersten beiden Reaktionen dieses β -Oxidationsweges beteiligt sind, die Succinyl-CoA-(R)-Benzylsuccinat:CoA-Transferase (BbsEF) und die (R)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase (BbsG), wurden bereits aus *T. aromatica* gereinigt und näher charakterisiert (Leutwein und Heider, 2001; Leutwein und Heider, 1999). Die Succinyl-CoA-(R)-Benzylsuccinat:CoA-Transferase erkennt stereospezifisch (R)-Benzylsuccinat und

aktiviert dieses Substrat zu einem definierten (*R*)-2-Benzylsuccinyl-CoA-Thioester (Leutwein und Heider, 2001; Leutwein und Heider, 1999). Das Enzym besteht aus zwei Untereinheiten mit ähnlicher Molekülmasse (44 und 45 kDa), die untereinander hohe Sequenzähnlichkeiten aufweisen und ein Heterotetramer der Komposition $\alpha_2\beta_2$ bilden (Leutwein und Heider, 2001; Leutwein und Heider, 1999). Die Succinyl-CoA-(*R*)-Benzylsuccinat:CoA-Transferase zeigt hohe Sequenzähnlichkeiten zur Oxalyl-CoA:Formiat-CoA-Transferase aus *Oxalobacter formigenes* und der (*E*)-Cinnamoyl-CoA:(*R*)-Phenyllactat-CoA-Transferase aus *Clostridium sporogenes*. Diese Enzyme gehören zu einer neuen Familie von CoA-Transferasen (Familie III), deren Reaktionsmechanismus über einen ternären Komplex zwischen Enzym und Substraten verläuft (Heider, 2001). Die (*R*)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase wurde heterolog in *E. coli* überproduziert, gereinigt und charakterisiert (Leutwein und Heider, 2001). Das Flavin-haltige Enzym bildet ein Homotetramer aus 45 kDa-Untereinheiten und das Produkt der Reaktion wurde von Leutwein und Heider (2001) als (*E*)-Phenylitaconyl-CoA identifiziert. Die Elektronen werden dabei vermutlich auf ein „Elektronen transferierendes Flavoprotein“ (ETF) übertragen (Abb. 3, A). C. Feil (2006) zeigte in ihrer Dissertation, dass (*E*)-Phenylitaconyl-CoA anschließend vom *bbsH*-Genprodukt, welches große Sequenzähnlichkeiten zu Enoyl-CoA-Hydratasen aufweist, zu 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA umgesetzt wird (Abb. 3, A).

Die letzten beiden enzymatischen Schritte bis zum Intermediat Benzoyl-CoA wurden bis heute noch nicht biochemisch charakterisiert. Im *bbs*-Operon sind jedoch offene Leserahmen identifiziert worden, deren Genprodukte hohe Sequenzähnlichkeiten zu Alkohol-Dehydrogenasen und Ketothiolasen aufweisen (K. Hermuth, 2002; Leuthner und Heider, 2000). Es wurde daher postuliert, dass auch die beiden folgenden Reaktionen analog zur bekannten β -Oxidation von Fettsäuren verlaufen. 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA wird vermutlich durch das *bbsCD*-Genprodukt in einer NAD-abhängigen Reaktion zu Benzoylsuccinyl-CoA oxidiert und im letzten Schritt durch eine β -Ketothiolase (BbsB) thiolytisch gespalten (siehe Abb. 3, A). Dabei entstehen das zentrale Intermediat Benzoyl-CoA und der CoA-Donor Succinyl-CoA. Der weitere Abbau von Benzoyl-CoA wird durch eine ATP-abhängige Benzoyl-CoA-Reduktase eingeleitet (Boll und Fuchs, 1995) und auch die folgenden Reaktionen und beteiligten Enzyme bis hin zum Acetyl-CoA sind bereits gut untersucht (Laempe et al., 1999). Succinat wird schließlich durch die Succinat-Dehydrogenase zu Fumarat oxidiert und steht damit der (*R*)-Benzylsuccinat Synthase als Kosubstrat wieder zur Verfügung (siehe Abb. 3, A).

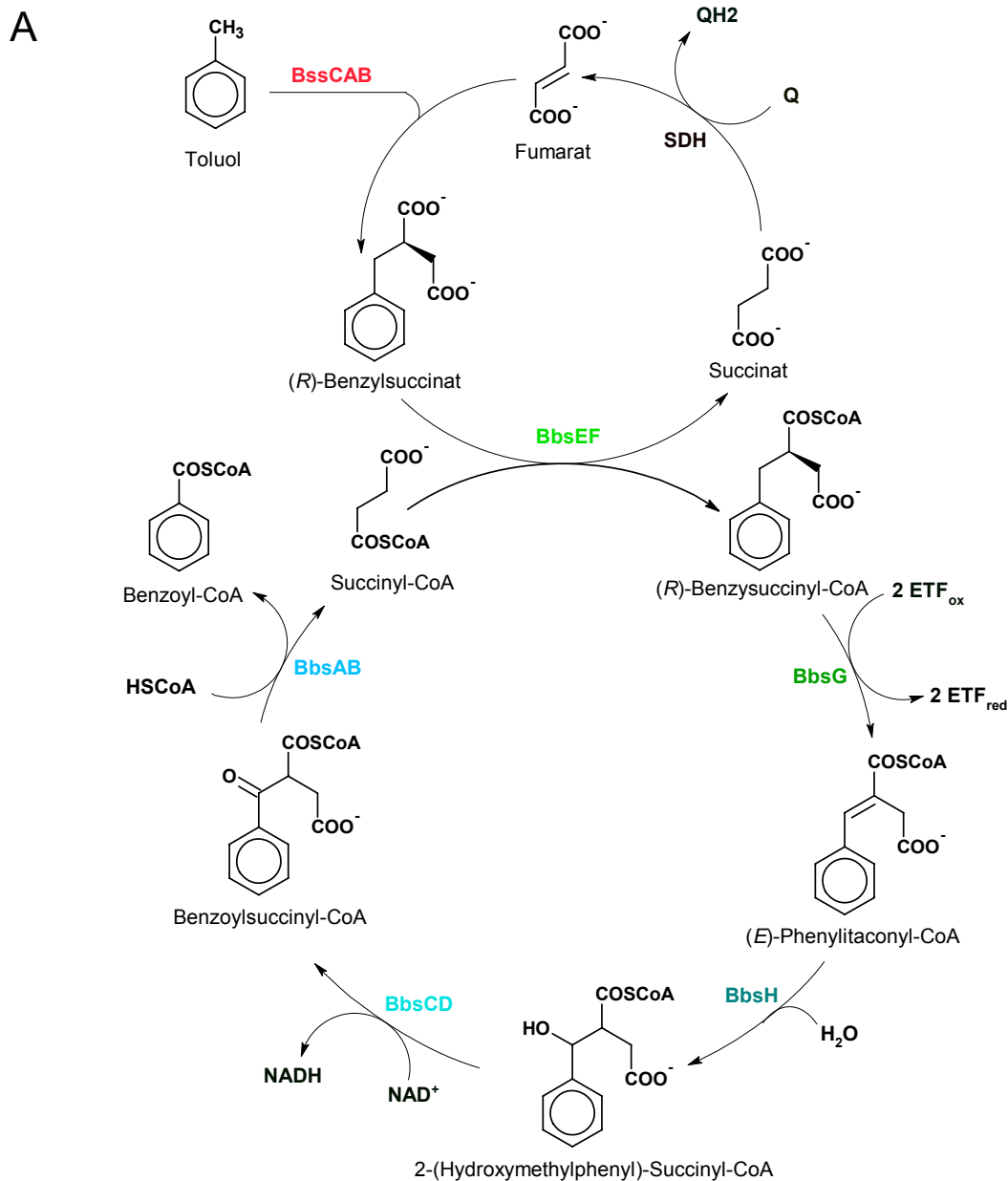


Abb. 3: Anaerober Abbau von Toluol in *T. aromatica*. **A:** Bildung von (R)-Benzylsuccinat aus Toluol und Fumarat und weiterer Abbauweg des ersten Intermediates über eine modifizierte β -Oxidation. Die beteiligten Enzyme sind: (R)-Benzylsuccinat-Synthase (BssCAB), Succinyl-CoA:Benzy succinat-CoA-Transferase (BbsEF), Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase (BbsG), (E)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase (BbsH), 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA Dehydrogenase (BbsCD), Benzoylsuccinyl-CoA-Thiolase (BbsAB) und die Succinat-Dehydrogenase (SDH). **B:** Die am Toluolabbau beteiligten Gene sind in zwei Operons organisiert. Das *bss*-Operon kodiert für die drei Untereinheiten der (R)-Benzylsuccinat-Synthase (BssCAB), das aktivierende Enzym (BssD) sowie für vier weitere Genprodukte unbekannter Funktion (BssEFGH). Im *bbs*-Operon sind Gene kodiert, deren Produkte an der β -Oxidation von (R)-Benzylsuccinat zu Benzoyl-CoA und Succinyl-CoA beteiligt sind (*bbs*ABCDEFGH).

Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit war die weitere Aufklärung der Biochemie des anaeroben Toluol-Stoffwechsels. Der Schwerpunkt lag bei der Reinigung und näheren Charakterisierung der β -Oxidations-Enzyme (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase, 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA Dehydrogenase und Benzoylsuccinyl-CoA-Thiolase, welche die Umsetzung von (*E*)-Phenylitaconyl-CoA zu Benzoyl-CoA und Succinyl-CoA katalysieren. Durch Überproduktion dieser Enzyme in *E. coli* sollten postulierte Enzymaktivitäten zugeordnet und der Abbauweg bestätigt werden. Ein zweiter Schwerpunkt stellte die Überprüfung der Aktivierbarkeit der rekombinanten (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase durch das aktivierende Enzym dar. Beide Enzyme lagen zu Beginn der Arbeit als heterolog exprimierte Fusionsproteine mit Tag-Anteilen vor.

III. Material und Methoden

1. Materialien

1.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden, falls nicht anders vermerkt, in der größtmöglichen Reinheit von den Firmen, Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Sigma-Aldrich (Taufkirchen), Gibco/BRL (Eggenstein), Riedel-de Häen (Seelze), Alpha Aesar (Karlsruhe) bezogen.

1.2 Biochemikalien

Coenzym A stammte von der Firma Gerbu (Gaiberg). Die übrigen Biochemikalien wurden von den Firmen Roche (Mannheim), GE Healthcare (Freiburg) und Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen. Polymerasen, T4-DNA-Ligasen und Restriktionsendonukleasen stammten von der Fermentas GmbH (St. Leon-Rot) und New England Biolabs (Frankfurt), Benzonase von Merck (Darmstadt).

1.3 Gase

Stickstoff (99,99 %) und Formiergas (5 % Wasserstoff, 95 % Stickstoff) wurden von Airliquide (Düsseldorf) bezogen.

1.4 Chromatographiematerial

Material und Ausrüstung für die Proteinreinigung stammen von den Firmen GE Healthcare (Freiburg), Merck (Darmstadt), Sigma-Aldrich (Taufkirchen), BioRad (München) und IBA (Göttingen).

2. Stämme, Plasmide und synthetische Oligonukleotide

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Stämme sind in Tab. 1 aufgelistet. *E. coli*-Stämme sind alle Derivate von *E. coli* K-12. Die verwendeten Plasmide sind in Tab. 2, die verwendeten synthetischen Oligonukleotide sind in Tab. 3 aufgeführt.

Tab. 1: Verwendete Stämme.

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>Thauera aromatica</i> Stamm K172	Wildtyp (DSM-Nr.: 6984)	Tschech und Fuchs, 1987
<i>Azoarcus</i> sp. Stamm T	Wildtyp (DSM-Nr.: 9506)	Dolfing et al., 1990
<i>E. coli</i> DH5 α	F ⁻ , ϕ 80lacZ Δ M15, Δ (lacZYA-argF)U169, deoR, recA1, endA1, hsdR17(rk ⁻ , mk ⁺), phoA, supE44, λ ⁻ , thi-1, gyrA96, relA1	Woodcook et al., 1989
<i>E. coli</i> Rosetta (DE3)	F ⁻ ompT hsdS _E (r _B ⁻ m _B ⁻) gal dcm pRARE (Cam ^R)	Novagen
<i>E. coli</i> TOP10	F ⁻ , mcrA, Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC), ϕ 80lacZ Δ M15, Δ lacX74, recA1, araD139, Δ (ara-leu)7697, galU, galK, rpsL (Str ^R), endA1, nupG	Invitrogen
<i>E. coli</i> BL21(DE)	F ⁻ dcm ompT hsdS (r _B ⁻ m _B ⁻) gal λ (DE3)	Studier und Moffat, 1986

Tab. 2: Verwendete Plasmide.

Stamm	Genotyp	Referenz
pCR-Script Amp SK(+)	Amp ^R	Stratagene
pJOE2775	Amp ^R	Stumpp et al., 2000
pBSS-Strep	Amp ^R	Doktorarbeit J. Hogg, 2008
pCR-Script- <i>GeobssCAB</i>	Amp ^R	diese Arbeit
pBAD/D102-TOPO- <i>bssD</i>	Amp ^R	Doktorarbeit J. Hogg, 2008
pGEX6P- <i>bssE</i>	Amp ^R	Doktorarbeit J. Hogg, 2008
pBAD/D102-TOPO- <i>bssG</i>	Amp ^R	Doktorarbeit J. Hogg, 2008
pJOE2775- <i>bssF</i>	Amp ^R	diese Arbeit
pCR-Script- <i>bbsH</i>	Amp ^R	Doktorarbeit B. Leuthner, 1999
pCR-Script- <i>bbsCD</i>	Amp ^R	Doktorarbeit B. Leuthner, 1999
pTrc99A- <i>bbsAB</i>	Amp ^R	Doktorarbeit K. Hermuth, 2002

Tab. 3: Verwendete synthetische Oligonukleotide. Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen sind unterstrichen.

Name	Sequenz
GeoBss_FR1_for	5' - AATCCGCTCGAGGTCAACCATGCAC - 3'
GeoBss_FR1_rev	5' - CGACATATGCTTTTCGAACTGCGGGTGGCTCCACATGAAT AACCCCTGTTTG - 3'
GeoBss_FR2_for	5' - GCGCATATGTCAACGGTTGCTGCATC - 3'
GeoBss_FR2_rev	5' - GCCGGATCCAGTATCACACATGTTCTC - 3'
bssF_NdeI_for	5' - CGCATATGCCCCCGGCTCCCGCC - 3'
bssF_BamHI_rev	5' - CGGGATCCGTGACGGGCGTCGTA - 3'
Seq_pTrc99A_for	5' - GGCAAATATTCTGAAATGAGCTGTTGA - 3'
Seq_pTrc99A_rev	5' - CTGATTTAATCTGTATCAGG
Seq_pJOE2775_for	5' - CGTTCATCTTTCCTGGTTGC - 3'
T3-Primer	5' - CCCTTTAGTGAGGGTTAATT-3'
T7-Primer	5' - TAATACGACTCACTATAGGGC- 3'

3. Medien und Puffer

Für die Herstellung aller Medien und Lösungen wurde deionisiertes Wasser verwendet. Kulturmedien und Puffer wurden durch autoklavieren (120°C, 20 Minuten), hitzelabile Lösungen durch Filtration mit Sterilfiltern (0,2 µm; Millipore, Eschborn) sterilisiert. Falls eine Anaerobisierung nötig war, wurden Medien und Supplemente vor dem Autoklavieren anaerobisiert, indem sie wiederholt mit 99,99 % Stickstoff begast und anschließend unter Vakuum entgast wurden. Die Zyklen dauerten 2 bis 3 Minuten, wobei 10 bis 20 Zyklen durchgeführt wurden.

3.1 Medien für die Kultivierung von *E. coli*

Luria-Bertani (LB)-Medium wurde als Vollmedium zur Anzucht von *E. coli* eingesetzt (Tab. 4). Nährböden wurden durch Zugabe von 1,5% Agar (w/v) hergestellt. Für eine Kultivierung unter anaeroben Bedingungen wurde TGYEP-Medium verwendet (Tab. 5).

Tab. 4: Luria-Bertani-Medium.

Luria-Bertani-Medium (Miller, 1972)	Einwaage
Trypton	10 g/l
Hefeextrakt	5 g/l
NaCl	5 g/l

Tab. 5: TGYEP-Medium.

TGYEP-Medium (Begg et al., 1977)	Einwaage
Trypton	10 g/l
Hefeextrakt	5 g/l
NaNO ₃	10 g/l

Trypton, Hefeextrakt und NaNO₃ wurden in destilliertem Wasser gelöst und autoklaviert. Anschließend wurde mit folgenden Lösungen komplementiert: 20 ml einer 20%igen Glucose-Stocklösung und 100 ml eines 1M Phosphatpuffers. Den Wachstumsmedien wurden, abhängig von Plasmid- oder Genomkodierten Resistenzen, Antibiotika zugesetzt (Tab. 6).

Tab. 6: Antibiotika.

Antibiotika	Stocklösung	Endkonzentration
Ampicillin	100 mg/ml	100 µg/ml
Chloramphenicol	30 mg/ml in Ethanol	30 µg/ml
Gentamycin	15 mg/ml	15 µg/ml

3.2 Medien für die Kultivierung von *T. aromatica* Stamm K 172

Tab. 7: Grundmedium für die Anzucht von *T. aromatica*.

Grundmedium pH 7,8:	Einwaage	Konzentration im Medium
NaH ₂ PO ₄	0,6 g/l	7,9 mM
K ₂ HPO ₄	5,6 g/l	32,1 mM
NH ₄ Cl	0,5 g/l	10,0 mM

Tab. 8: Benötigte Stocklösungen für die Anzucht von *T. aromatica*.

Stocklösungen:	Einwaage	Konzentration im Medium
0,8 M MgSO ₄ x 7 H ₂ O	198 g/l	0,8 mM
0,1 M CaCl ₂ x 2 H ₂ O	15 g/l	0,1 mM
1,5 M NaNO ₃	13 g/100 ml	8,0 mM

Tab. 9: Vitaminlösung.

Vitaminlösung VL-7 (1000-fach) (Pfennig, 1978)	
	Einwaage
Cyanocobalamin (B12)	100 mg/l
Pyridoxamindihydrochlorid (B6)	300 mg/l
Thiamindichlorid (B1)	20 mg/l
Ca-D(+)-Pantothenat	100 mg/l
4-Aminobenzoessäure	80 mg/l
D(+)-Biotin	20 mg/l
Nicotinsäure	200 mg/l

Tab. 10: Spurenelementelösung.

Spurenelementelösung SL-10 (1000-fach) (Widdel, et al. 1983)	
	Einwaage
HCl (25%)	50ml/l
FeCl ₂ x 4 H ₂ O	7500 mg/l
ZnCl ₂	350 mg/l
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	500 mg/l
H ₃ BO ₄	30 mg/l
CoCl ₂	950 mg/ml
CuCl ₂	10 mg/ml
NiCl ₂	120 mg/ml
Na ₂ MoO ₄	180 mg/ml

Das Grundmedium und die Stocklösungen wurden separat autoklaviert. Dem autoklavierten und abgekühlten Medium wurden die in Tab. 11 aufgeführten Zusätze aus sterilen Stammlösungen zugesetzt.

Tab. 11: Komplementierung des Grundmediums für die Anzucht von *T. aromatica*.

	Zugegebene Menge
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	1 ml/l
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	1 ml/l
Vitaminlösung VL-7	1 ml/l
Spurenelementelösung SL-10	1 ml/l
NaNO ₃	5 ml/l

3.3 Medien für die Kultivierung von *Azoarcus* sp. Stamm T

Tab. 12: Grundmedium für die Anzucht von *Azoarcus* sp. Stamm T.

Grundmedium pH 7,8	Einwaage	Konzentration im Medium
K ₂ HPO ₄	0,5 g/l	3,7 mM
NH ₄ Cl	0,3 g/l	5,6 mM
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,5 g/l	2,0 mM
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,1 g/l	0,7 mM

Tab. 13: Benötigte Stocklösungen für die Anzucht von *Azoarcus* sp. Stamm T.

Stocklösungen	Einwaage	Konzentration im Medium
1 M NaHCO ₃	84 g/l	1 mM
1,5 M NaNO ₃	13 g/l	10 mM

Tab. 14: Spurenelementelösung.

Spurenelementelösung II (1000-fach); (Rabus und Widdel, 1995)	
	Einwaage
Na ₂ -EDTA	5200 mg/l
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	2100 mg/l
H ₃ BO ₄	30 mg/l
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	100 mg/l
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	190 mg/l
NiCl ₂ x 6 H ₂ O	24 mg/ml
CuCl ₂ x 2 H ₂ O	29 mg/ml
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	144 mg/ml
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	36 mg/ml

Der pH-Wert wurde mit NaOH auf pH 6,5 eingestellt. Dem autoklavierten und abgekühlten Medium wurden die in Tab. 15 aufgeführten Zusätze aus sterilen Stammlösungen zugesetzt.

Tab. 15: Supplemente für das Grundmedium für *Azoarcus* sp. Stamm T.

	Zugegebene Menge
Spurenelementelösung II	1 ml/l
Vitaminlösung VL-7 (Tab. 9)	1 ml/l
NaHCO ₃	40 ml/l
NaNO ₃	10 ml/l

4. Kultivierung von Bakterien und Herstellung von Zellextrakten

4.1 Kultivierung von *E. coli*

Die Anzucht der in Tab. 1 aufgeführten *E. coli*-Stämme erfolgte unter aeroben Bedingungen bei 37°C und 180 rpm in Luria-Bertani (LB)-Medium (Material und Methoden 3.1, Tab. 4). Für die anaerobe Anzucht von *E. coli*-Stämmen unter anaeroben Bedingungen wurden Kulturflaschen mit Stopfen verwendet, die komplett mit TGYEP-Medium (Material und Methoden 3.1, Tab. 5) aufgefüllt waren. Antibiotika wurden wie in Material und Methoden 3.1 (Material und Methoden 3.1, Tab. 6) beschrieben zugefügt und die Kulturen bei 37°C stehend inkubiert. Das Wachstum der Kulturen wurde über Bestimmung der Optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 578 nm in einem SpectraPhotometer (GE Healthcare, Freiburg) verfolgt.

4.2 Kultivierung von *T. aromatica* und *Azoarcus* sp. Stamm T

T. aromatica Stamm K172 und *Azoarcus* sp. Stamm T wurden unter anaeroben, denitrifizierenden Bedingungen auf Toluol bzw. Benzoat als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle in Mineralsalzmedium mit den jeweiligen Supplementen (Material und Methoden 3.2 und 3.3) in 2l-Anzuchtflaschen kultiviert. Nitrat wurde bei der Kultivierung von *T. aromatica* auf Toluol (2 mM) bzw. Benzoat (5 mM) in einer Anfangskonzentration von 8 mM bzw. 10 mM zugesetzt. Bei Kultivierung von *Azoarcus* sp. Stamm T auf Toluol (2 mM) bzw. Benzoat (5 mM) wurden 8 mM bzw. 15 mM Nitrat zugefügt. Toluol und ist für die Zellen in einer Konzentration von 1-2 mM toxisch. Daher wurden die Toluol-Kulturen mit 2 % (v/v) Paraffin oder SilikonölM50 (Roth, Karlsruhe) als organische Trägerphase überschichtet, in der der größte Teil der Kohlenwasserstoffe gelöst ist. Das Animpfen erfolgte mit 1 % (v/v) einer wachsenden Bakterienkultur. Die Kulturen wurden unter ständigem schütteln (80-90 rpm) bei 28°C bis 30°C inkubiert. Dadurch entstand eine Emulsion mit großer Oberfläche für die Bereitstellung von Toluol. Zur Kontrolle des Nitrat/Nitrit-Gehalts wurden Teststäbchen (Quantofix® Nitrat; Macherey-Nagel, Düren) verwendet. Das Wachstum wurde über Messung der OD_{578nm} verfolgt. Da das Paraffinöl zu einer erhöhten optischen Dichte führt, wurden für die OD_{578nm}-Bestimmung 1 ml der Kultur abzentrifugiert (10 Minuten bei 4°C und 5000 rpm, (Centrifuge 5804R, Eppendorf, Hamburg) und das Zellpellet anschließend mit der gleichen Menge an Grundmedium resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde anschließend für die Bestimmung der OD_{578nm} verwendet. Die Zellen wurden in der exponentiellen Wachstumsphase bei einer OD_{578nm} von ca. 1,5 bis 2,5 unter anaeroben Bedingungen geerntet (Material und Methoden 4.3).

4.3 Zellernte unter aeroben und anaeroben Bedingungen

Zellernte unter aeroben Bedingungen. Zellen von *E. coli* nach *in-vitro* Überproduktion Plasmidkodierter Gene (Material und Methoden 6.1, Tab. 16) wurden in der exponentiellen Wachstumsphase bei einer OD_{578nm} von 2,0 bis 4,0 unter aeroben Bedingungen geerntet. Dazu wurden die Kulturen in 500 ml-Zentrifugenbecher überführt und für 10 bis 20 Minuten bei 8000 rpm zentrifugiert (Sorvall Discovery M120, Kendro). Die Zellen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C aufbewahrt.

Zellernte unter anaeroben Bedingungen. Die Ernte aus 2 l-Anzuchtflaschen (*T. aromatica* bzw. *Azoarcus* sp. Stamm T) erfolgte in der exponentiellen Wachstumsphase bei einer OD_{578nm} von > 2,0. Zellen von *E. coli* BL21(DE3) mit dem Plasmid pBSS-Strep bzw. *E. coli* TOP10 wurden bei einer OD_{578nm} von 2,0 bis 4,0 geerntet. Alle benötigten Puffer wurden zuvor durch 10 Stickstoffbegasungs- und Vakuumzyklen anaerobisiert. Zur Ernte wurden die Kulturen in einem Anaerobenzelt (Coy Instruments, Grass Lake, MI, USA) in 500 ml-Zentrifugenbecher überführt. 2 l-Anzuchtflaschen mit *T. aromatica* bzw. *Azoarcus* sp. Stamm T wurden mit einer Vorrichtung (Abb. 4) versehen, welche die Ernte der Kulturen unter Abtrennung der nun störenden Paraffinschicht durch Flotation ermöglichte (K. Verfürth, 2005). Die Zentrifugenbecher wurden mindestens 3 Tage vor der Ernte im Anaerobenzelt inkubiert, damit der Sauerstoff der im Plastikmaterial gelöst war, ausdiffundierte. Die befüllten, luftdicht verschlossenen Zentrifugenbecher wurden aus dem Anaerobenzelt ausgeschleust und für 10 bis 15 Minuten bei 6000 rpm und 4°C zentrifugiert. Die Zentrifugenbecher wurden anschließend wieder in das Anaerobenzelt geschleust und der Überstand abgenommen. Die Zellpellets wurden in 10 mM TEA/NaOH (pH 7,5) resuspendiert, in 500 ml-Zentrifugenbecher überführt und nochmals für 10 Minuten bei 6000 rpm und 4°C zentrifugiert. Anschließend wurden die Zentrifugenbecher in das Anaerobenzelt geschleust, der Überstand verworfen und sofort Zellextrakt präpariert (Material und Methoden 4.4).

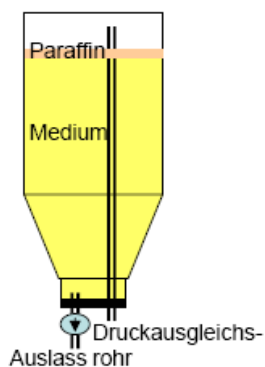


Abb. 4: Ernte der Kulturen aus 2 l-Flaschen (nach K. Verfürth, 2005). Um die mit Toluol angereicherte Paraffinschicht zu entfernen, wurde eine Vorrichtung benutzt, welche das Paraffin durch Flotation von der Kultur abtrennt. Da Paraffin eine geringere Dichte als das Medium hat, setzt es sich an der Oberfläche ab, während das Medium unten verwirbelungsfrei entnommen werden kann.

4.4 Präparation von Zellextrakten unter aeroben und anaeroben Bedingungen

Präparation von Zellextrakten unter aeroben Bedingungen. Frisch geerntete oder gefrorene Zellen von *E. coli* nach *in-vitro* Überproduktion Plasmidkodierter Gene (Tab. 16) wurden in einem oder zwei Volumen (w/v) Aufschlusspuffer [10 mM Tris/HCl (pH 7,5);

10 % (v/v) Glycerin; 10 mM MgCl₂; 1-2 U Benzonase (Merck, Darmstadt)] aufgenommen und auf Eis resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte in einem Zellaufschlussgerät (Constant Cell Disruption Systems, Northants, UK) bei einem Druck von 1,35 kbar. Der Aufschluss wurde anschließend für 1 Stunde bei 35000 rpm und 4°C in einer Ultrazentrifuge zentrifugiert (Beckman Ultrazentrifuge, 45 Ti- oder 70 Ti-Festwinkelrotor). Der Überstand wurde entweder sofort weiter verwendet oder bei -80°C gelagert.

Präparation von Zellextrakten unter anaeroben Bedingungen. Bei Zellaufschlüssen unter strikt anaeroben Bedingungen (*T. aromatica* bzw. *Azoarcus* sp. Stamm T; *E. coli* TOP10 mit dem Plasmid pBADTOPO/D102-*bssD* bzw. *E. coli* BL21(DE3) mit pBSS-Strep) wurden die Zellen im Anaerobenzelt in einem bis zwei Volumen (w/v) 10 mM TAE/NaOH (pH 7,5) mit 1-2 U ml⁻¹ Benzonase (Merck, Darmstadt) und 10 % (v/v) Glycerin aufgenommen. Der Puffer wurde zuvor durch 10 Stickstoffbegasungs- und Vakuumzyklen anaerobisiert. Die Zellsuspension wurde in die vorgekühlte French-Press-Zelle (American Instruments Company, Maryland, USA) überführt und aus dem Anaerobenzelt geschleust. Der Aufschluss wurde mit einer Kanüle in eine anaerobe Anzuchtflasche eingeleitet, die mit einem Gummistopfen verschlossen war. Diese Anzuchtflasche wurde erneut in die Anaerobenkammer geschleust und die aufgeschlossenen Zellen wurden in Ultrazentrifugenbecher überführt, die mindestens 3 Tage vor dem Aufschluss in das Anaerobenzelt eingeschleust wurden. Anschließend wurden die Zentrifugenbecher wieder aus dem Zelt geschleust und der Aufschluss wurde für 1 Stunde bei 35000 rpm und 4°C in einer Ultrazentrifuge zentrifugiert (Beckman Ultrazentrifuge, 45 Ti- oder 70 Ti-Festwinkelrotor). Die Zentrifugenbecher wurden nach der Ultrazentrifugation wieder in das Anaerobenzelt geschleust und entweder direkt weiter verwendet oder in luftdicht verschließbaren Gefäßen bei -80°C gelagert.

4.5 Stammkulturhaltung

***T. aromatica* Stamm K172 und *Azoarcus* sp. Stamm T.** Zur Herstellung von Stammkulturen von *T. aromatica* K172 bzw. *Azoarcus* sp. Stamm T wurden 10 ml einer exponentiell wachsenden Kultur in sterilen Hungate-Röhrchen für 10 Minuten bei 4°C und 5000 rpm (Hettich EBA 8S, Tuttlingen) abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet wurde in 1 ml komplettiertem Grundmedium mit 5 % (v/v) sterilem DMSO

resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in sterile 2-ml-Kryoröhrchen (Nalgene, Wiesbaden) überführt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

Escherichia coli. *Escherichia coli*-Einzelkolonien wurden auf LB/Antibiotika Platten dicht ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Kolonien wurden anschließend in 2 ml LB-Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in ein 2 ml Kryoröhrchen (Nalgene, Wiesbaden) überführt, mit 5 % (v/v) sterilem DMSO vermischt, anschließend sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

5. Molekularbiologische und Genetische Methoden

5.1 Isolierung genomischer DNA

Chromosomale DNA aus *T. aromatica* und *G. metallireducens* wurde nach Murray und Thomson (1980) isoliert. Dazu wurden 60 mg gefrorene Zellen in 570 µl TE-Puffer [10 mM Tris/HCl (pH 8,0); 1 mM EDTA] resuspendiert und anschließend 30 µl einer 10 %igen (w/v) SDS-Lösung zugegeben. Zum Abbau der Proteine wurden 3 µl ProteinaseK-Lösung [20 mg/ml TE-Puffer] zugeführt. Der Ansatz wurde gemischt und für 1 Stunde bei 50°C inkubiert. Anschließend wurden 100 µl einer 5 M NaCl-Lösung und 80 µl einer auf 65°C erwärmten CTAB/NaCl-Lösung [10 % (w/v) Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB); 0,7 M NaCl] zugegeben, invertiert und dann für 10 Minuten bei 65°C inkubiert. Dies bewirkte die Fällung der Zellwand, der denaturierten Proteine und Polysaccharide durch Komplexierung, während die Nukleinsäuren in Lösung blieben. Die wässrige Lösung wurde mit 700 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1 (v/v)) extrahiert. Nach Zentrifugation (10 Minuten bei 13200 rpm) wurde die obere, wässrige Phase in ein neues Eppendorfgefäß überführt und die Extraktion noch einmal wiederholt. Danach wurde die in ein neues Eppendorfgefäß überführte Phase zur Fällung der DNA mit 400 µl Isopropanol überschichtet und vorsichtig mit der wässrigen Phase gemischt. Der an der Grenzschicht auftretende DNA-Faden wurde in ein Eppendorfgefäß mit 200 µl 70 %igem (v/v) Ethanol überführt und für 10 Minuten bei 13200 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Niederschlag wurde mittels Vakuumzentrifugation getrocknet (SpeedVac; Eppendorf, Hamburg), in 100 µl TE-Puffer mit RNaseA [10 mM Tris/HCl (pH 8,0); 1 mM EDTA; 10 mg/ml RNaseA] aufgenommen und bei 4°C gelagert.

5.2 Isolierung von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA wurde aus 5 ml Übernacht-Kulturen in LB/Antibiotika-Medium durch alkalische Lyse präpariert (Sambrook et al., 1989). Die Zellen wurden abzentrifugiert (5000 rpm, 4°C, 5 Minuten) und in 200 µl Lösung A [25 mM Tris/HCl; 10 mM EDTA (pH 8,0)] resuspendiert. Der Ansatz wurde 5 Minuten lang bei RT inkubiert. Dann wurden 250 µl Lösung B [0,2 M NaOH; 1 % (w/v) SDS] zur alkalischen Lyse der Zellen zugesetzt. Der Ansatz wurde gemischt und 5 Minuten lang auf Eis inkubiert. Zur Neutralisierung und Fällung der Proteine wurde 180 µl eiskalte Lösung C [3 M Kaliumacetat (pH 4,8)] zugesetzt. Der Ansatz wurde gemischt und für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (8000 rpm, 4°C, 5 Minuten) wurde der erhaltene Überstand mit 400 µl Phenol/Chloroform-Lösung gemischt. Der Ansatz wurde 2 Minuten lang auf Eis inkubiert und anschließend die Phasen durch Zentrifugation (8000 rpm, 4°C, 5 Minuten) getrennt. Die wässrige Phase wurde mit 800 µl eiskaltem Ethanol zur Fällung der DNA versetzt und die Probe für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (10000 rpm 4°C, 15 Minuten) wurde der Überstand verworfen und der Niederschlag mit 200 µl eiskaltem 70%igem (v/v) Ethanol gewaschen. Der Niederschlag wurde mittels Vakuumzentrifugation (SpeedVac; Eppendorf, Hamburg) getrocknet, in 20 µl H₂O oder TE-Puffer [10 mM Tris/HCl (pH 8,0); 1 mM EDTA] aufgenommen und anschließend wurden 2 µl RNaseA-Lösung [10 mg/ml] zugesetzt. Für Sequenzierungen wurden Plasmide mit Hilfe des pGOLD Plasmid Miniprep-Kit (PheLab, Erlangen) nach Angaben des Herstellers isoliert.

5.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der Technik der Polymerase-Kettenreaktion (PCR; Saiki et al., 1988) wurden DNA-Fragmente aus *T. aromatica* bzw. *G. metallireducens* amplifiziert und mit Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen zur Klonierung in Expressionsvektoren versehen.

Die PC-Reaktionen wurden in einem Volumen von 50 µl in dem Mastercycler Gradient (Eppendorf, Hamburg) durchgeführt. Der initiale Denaturierungsschritt der DNA-Stränge der Matrize erfolgte für 5 Minuten bei 95°C. Die Temperatur für die Anlagerung der synthetischen Oligonukleotide wurde entsprechend ihrer Länge und ihres GC-Gehaltes gewählt und lag zwischen 50 und 65°C. Die Anlagerung wurde für 30 bis 60 Sekunden

durchgeführt. Im dritten Schritt erfolgte die Polymerisation bei 72°C für einen Zeitraum, der von der Länge der zu amplifizierenden DNA abhängig war (30 Sekunden pro 1 kb). Die drei PCR-Schritte wurden 29 mal wiederholt, wobei die Denaturierung nur für 45 Sekunden bei 95°C durchgeführt wurde. Im letzten PCR-Zyklus wurde die Polymerisationszeit auf 5 bis 10 Minuten erhöht, um alle neu synthetisierten DNA-Stränge vollständig zu verlängern. Ein Standard-PCR-Ansatz ist in Tab. 16 dargestellt.

Tab. 16: Komponenten im Standard-Reaktionsansatz.

Komponenten	Endkonzentration im Reaktionsansatz
5xPhusion GC-Buffer	1x
dNTP-Mix	200 µM jeden dNTP's
Primer forward	0,2 µM
Primer reverse	0,2 µM
DMSO	3 %
chromosomale DNA	50 - 250 ng
Polymerase*	0,02 U µl ⁻¹
H ₂ O bid.	ad 50 µl

* Phusion® High-Fidelity-Polymerase (New England Biolabs, Frankfurt)

Neben der präparativen PCR zur Gewinnung bestimmter DNA-Fragmente in großer Menge wurde die PCR auch zur Analyse von Klonen eingesetzt (Kolonie-PCR). Einzelne Bakterienklone wurden direkt auf das Vorhandensein bestimmter DNA-Abschnitte überprüft. Dazu wurde anstelle der DNA eine Einzelkolonie von einer Agarplatte gepickt und in 10 µl H₂O bid. überführt. Erst danach wurden die restlichen Komponenten des PCR-Ansatzes hinzugefügt (Tab. 16) und auf 50 µl mit H₂O bid. aufgefüllt.

Alle PCR-Reaktionen wurden durch Agarosegel-Elektrophorese (Material und Methoden 5.5) überprüft. In der Regel wurden dazu 10 µl auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen. Bei PCR-Produkten, die anschließend einem Restriktionsverdau unterzogen werden sollten, wurde der PCR-Puffer entfernt, da die eingesetzten Restriktionsenzyme andere Puffer benötigen (Material und Methoden 5.4).

5.4 DNA-Fällung

Die DNA-Lösung wurde mit 1 Volumen Phenol/Chloroform [25:24 (v/v)] versetzt, gemischt und 5 Minuten bei 10000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, mit 1 Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol [25:24:1 (v/v)] versetzt und für 5 Minuten bei 10000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder abgenommen, mit 3 Volumen 100%igem Ethanol (v/v) versetzt und für 30 Minuten bei -20°C gefällt. Anschließend wurde die DNA 5 Minuten bei 10000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen, die DNA mit 70%igem Ethanol (v/v) gewaschen und erneut zentrifugiert. Nach Abdekantieren des Überstands wurde die DNA getrocknet und in einem entsprechenden Volumen Wasser aufgenommen. Alternativ dazu wurde zur Reinigung von PCR-Produkten und Restriktionsansätzen das peqGOLD Cycle-Pure Kit (Peqlab, Erlangen) nach Herstellerangaben verwendet.

5.5 Elektrophoretische Auftrennung von DNA

Die analytische und präparative Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese. Dafür wurden Gele mit 1 % (w/v) Agarose in TAE-Puffer [40 mM Tris; 40 mM Essigsäure; 1 mM EDTA] verwendet. Vor dem Lauf wurde zu den Proben 10 x DNA-Probenpuffer [50% (w/v) Glycerin; 0,1 M EDTA; 1% (w/v) SDS; 0,1 % (w/v) Bromphenolblau] gegeben. Zur Bestimmung der DNA-Fragment-Größen diente die „2-LogDNA Ladder“ von New England Biolabs (Frankfurt), der GeneRuler™ 1kb“ oder „GeneRuler™ 1 kb Plus“ von der Fermentas GmbH (St. Leon-Roth). Der Gellauf wurde in einer „PerfectBlue Gelsystem Mini“- oder „PerfectBlue Breitformat Gelsystem“-Agarosegel-Laufkammer (Peqlab, Erlangen) bei konstant 100 V für 30-60 Minuten durchgeführt. Die Detektion und Dokumentation der aufgetrennten DNA erfolgte auf einem UV-Transilluminator bei 304 nm (Bachhofer, Reutlingen).

5.6 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Um DNA-Fragmente zu reinigen und um einzelne DNA-Fragmente aus Gemischen zu isolieren wurden die DNA-Fragmente über Agarosegelen getrennt (Material und Methoden

5.5) und anschließend daraus eluiert. Hierzu wurde das Fragment unter mildem UV-Licht (312 nm) aus dem Agarosegel ausgeschnitten und nach Anleitung des Herstellers mit einem peqGOLD Gel Extraktion Kit (Peqlab, Erlangen) aus dem Gel isoliert.

5.7 Klonierungstechniken

Restriktion. Restriktionen von DNA (1-10 μg) mit verschiedenen Restriktionsenzymen (mind. 1 U μg^{-1} DNA; Fermentas GmbH, St. Leon-Rot; New England Biolabs, Frankfurt) wurden nach den Angaben der Hersteller in den jeweils empfohlenen 10x Reaktionspuffern durchgeführt. Restriktionsansätze mit Plasmid-DNA wurden für mindestens 1 Stunde bei den entsprechenden Temperaturen inkubiert. Für Ansätze in denen zwei verschiedene Restriktionsenzyme gleichzeitig verwendet wurden, wurde ein Puffer verwendet, in dem beide Enzyme möglichst hohe Aktivität aufwiesen. Bei Verwendung von Hitze-inaktivierbaren Enzymen wurden die Ansätze anschließend 10 Minuten auf 65°C erhitzt. Zur Überprüfung der Restriktionen wurden 5 μl der Ansätze durch Agarosegel-Elektrophorese (Material und Methoden 5.5) aufgetrennt. Die Restriktionsansätze wurden über das peqGOLD Cycle-Pure Kit (Peqlab, Erlangen) gereinigt (Material und Methoden 5.4).

Ligation. DNA-Fragmente (100-200 ng Plasmid-DNA, 200-600 ng DNA-Fragment) wurden in 20 μl -Ansätzen mit T4-DNA-Ligase (1 U μl^{-1} ; Fermentas GmbH, St. Leon-Rot oder New England Biolabs, Frankfurt) für 2 Stunden bei 21°C bzw. 4-18 Stunden bei 16°C in Gegenwart von 1 mM ATP inkubiert. Die Plasmid-DNA und die „Insert“-DNA wurden dabei in einem molaren Verhältnis von 1:3 bis 1:5 eingesetzt. Der gesamte Ligationsansatz wurde anschließend direkt zur Transformation von chemisch kompetenten Zellen verwendet (Material und Methoden 5.9).

5.8 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

Ausgehend von einer Einzelkolonie des betreffenden *E. coli* Stammes wurde eine 5 ml Übernachtskultur angezogen. Mit dieser Kultur wurden 400 ml SOB-Medium [2,0 % (w/v) Trypton; 0,5 % (w/v) Hefe-Extrakt; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl_2 ; 10 mM MgSO_4] angeimpft und bis zu einer $\text{OD}_{578\text{nm}}$ von 0,4 bis 0,6 bei 18°C inkubiert. Anschließend

wurden die Zellen für 10 Minuten auf Eis inkubiert und dann bei 4°C und 5000 rpm (Centrifuge 5804 R; Eppendorf, Hamburg) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 25 ml kaltem Transformationspuffer [10 mM PIPES; 15 mM CaCl₂; 250 mM KCl (pH 6,7); 55 mM MnCl₂] resuspendiert. Es folgte eine Inkubation auf Eis für 10 Minuten und anschließende Zentrifugation bei 5000 rpm und 4°C für 10 Minuten. Nach Aufnahme der Zellen in 5 ml Transformationspuffer wurden 7 % (v/v) steriles DMSO hinzugefügt, Aliquots zu je 50 µl in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

5.9 Transformation chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

Ein Aliquot chemisch kompetenter Zellen (Material und Methoden 5.8) wurde auf Eis aufgetaut und mit 1 µl Plasmid-DNA (10-40 ng) bzw. kompletten Ligationsansätzen (20 µl) versetzt. Der Ansatz wurde für 10-14 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock (42°C, 30 Sekunden) wurden die Zellen nochmals für 2 bis 5 Minuten auf Eis inkubiert und nach Zugabe von 100 µl LB-Medium für 30-60 Minuten bei 37°C inkubiert (800 rpm; Thermomixer5436; Eppendorf, Hamburg). Anschließend wurde der gesamte Ansatz auf eine LB-Agarplatte mit entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen und bei 37°C über Nacht inkubiert.

5.10 Konstruktion von Plasmiden

Klonierung der (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase aus *G. metallireducens*. Das Plasmid pCR-Script-*GeobssCAB* entstand durch Amplifikation der Gene *bssCAB* mit genomischer DNA von *G. metallireducens* als Vorlage in zwei Teilfragmenten. Für Fragment 1 wurde das Primerpaar GeoBss_FR1_for/GeoBss_FR1_rev und für Fragment 2 das Primerpaar GeoBss_FR2_for/GeoBss_FR2_rev verwendet (siehe Tab. 3). Die erhaltenen Fragmente (Fragment 1: 200 bp, Fragment 2: 2900 bp) wurden gereinigt und einem Restriktionsverdau mit den Restriktionsendonukleasen *XhoI* und *NdeI* (Fragment 1) bzw. *NdeI* und *BamHI* (Fragment 2) unterzogen. Anschließend wurden beide Ansätze erneut gereinigt und in den mit *XhoI* und *BamHI* hydrolysierten und gereinigten Vektor pCR-Script Amp SK(+) ligiert.

Klonierung von *bssF* aus *T. aromatica*. Das Plasmid pJOE2702-*bssF* entstand durch Amplifikation des Gens mit genomischer DNA von *T. aromatica* als Vorlage mit dem Primerpaar *bssF_NdeI_for/bssF_BamHI_rev* (Tab. 3). Anschließend wurde das etwa 1700 bp große PCR-Fragment gereinigt und mit den Restriktionsendonukleasen *NdeI* und *BamHI* hydrolysiert. Der Ansatz wurde anschließend erneut gereinigt und in den ebenso geschnittenen und gereinigten Vektor pJOE2702 ligiert.

Alle hier beschriebenen Ligationsansätze wurden in chemisch kompetente *E. coli* DH5α transformiert. Bei den neu konstruierten Plasmiden wurde die Korrektheit durch Kolonie-PCR, Kontrollrestriktionen mit entsprechenden Restriktionsendonukleasen und DNA-Sequenzanalyse verifiziert (Material und Methoden 5.3, 5.7 und 5.11).

5. 11 Sequenzanalyse

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA erfolgte nach dem Prinzip des „Cycle Sequencing“ (Sanger et al., 1977) und wurde durch die Firma GATC (Konstanz) durchgeführt. Als Primer fanden synthetische Oligonukleotide (siehe Tab. 3) Verwendung. Zum Vergleich von DNA-Sequenzen mit Sequenzen aus der DNA- und Proteindatenbank wurden Programme verwendet, die über das Internet frei zugänglich sind. Insbesondere wurde die Datenbank des National Center for Biotechnology Informations (NCBI, (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)) eingesetzt. Die Analyse der Nukleotidsequenzen erfolgte mit dem Programm DNAMAN4.11 (Lynnon BioSoft, Vaudreuil-Dorion, Kanada).

6. Biochemische Methoden

6.1 *In vivo*-Überexpression Plasmidkodierter Gene in *E. coli*

Für die heterologe Expression der Gene des anaeroben Toluolabbaus wurden *E. coli*-Stämme mit den durch Minipräparation erhaltenen Plasmid-Konstrukten transformiert (Tab. 17). Mit einer Einzelkolonie wurden Übernachtskulturen in 10 bis 50 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum angeimpft (Material und Methoden 3.1, Tab. 4 und 6). Diese dienten als Inokulum für die Überexpressionskultur (200 ml bis 1 l LB-Medium). Die

Kulturen wurden bei 180 rpm bei 37°C bis zu einer OD_{578nm} von 0,4-0,6 inkubiert und anschließend wurde durch Zugabe der jeweiligen Induktoren die Genexpression induziert (Tab. 17). Nach der Induktion wurden die Kulturen für weitere 3 bis 4 Stunden inkubiert und in der expotentiellen Wachstumsphase bei einer OD_{578nm} von 2,0 bis 4,0 geerntet (Material und Methoden 4.3). Die Präparation von Zellextrakten erfolgte wie in Material und Methoden 4.4 beschrieben unter aeroben Bedingungen. *E. coli*-Zellen mit dem Plasmid pBADTOPO/D102-*bssD* bzw. pBSS-Strep wurden unter anaeroben Bedingungen geerntet und aufgeschlossen (Material und Methoden 4.3 und 4.4). Zur Überprüfung der Überproduktion wurde vor Induktion und zu verschiedenen Zeitpunkten nach Induktion (1, 2, 3 und 4 Stunden) jeweils 1 ml der Kultur entnommen. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (13200 rpm, 10 Minuten, 4°C) geerntet und in SDS- Probenpuffer resuspendiert. Pro 1 ml Kultur mit einer OD_{578nm} von 1 wurden 100 µl Probenpuffer eingesetzt. Die Proben wurden für 5 Minuten auf 95°C erhitzt und anschließend 10-20 µl über SDS-Polyacrylamidgele (Material und Methoden 6.5) analysiert. Als Negativkontrolle wurden Zellen ohne Plasmid unter denselben Bedingungen angezogen.

Tab. 17: Verwendete *E. coli*-Stämme mit den jeweiligen Plasmid-Konstrukten und eingesetzten Induktoren.

Plasmid	Promotor	<i>E. coli</i> -Stamm	Konzentration Induktor
pBSS-Strep	T7	BL21(DE3)	1 mM IPTG*
pCR-Script- <i>GeobssCAB</i>	T7	BL21(DE3), Rosetta(DE3)	1 mM/100 mM IPTG*
pBADTOPO/D102- <i>bssD</i>	<i>araBAD</i>	TOP10	0,002-0,02 % Arabinose
pGex6P- <i>bssE</i>	<i>tac</i>	BL21(DE3), Rosetta(DE3)	1 mM/100 mM IPTG*
pBADTOPO/D102- <i>bssG</i>	<i>araBAD</i>	TOP10	0,0002-0,2 % Arabinose
pJOE2775- <i>bssF</i>	<i>rhaBAD</i>	DH5α	0,2 % L-Rhamnose
pCR-Script- <i>bbsH</i>	T7	BL21 (DE3)	1 mM IPTG*
pCR-Script- <i>bbsCD</i>	T7	BL21 (DE3)	1 mM IPTG*
pTrc99A- <i>bbsAB</i>	<i>trc</i>	DH5α	1 mM IPTG*

* IPTG: Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid

Ermittlung von optimalen Überexpressionsbedingungen. Wurde unter den oben genannten Bedingungen keine Expression der Plasmidkodierten Gene beobachtet, waren für weitere Überproduktionsversuche folgende Parameter geändert: 1. Die Zellen wurden in LB-Medium bei 37°C bis zu einer OD_{578nm} von 0,4 bis 0,6 angezogen. Nach Induktion mit den jeweiligen Induktoren (Tab. 17) wurden die Kulturen bei niedrigeren Temperaturen (20°C, 28°C) für weitere 3 bis 4 Stunden inkubiert. 2. Die Zellen wurden unter anaeroben Bedingungen in TGYEP-Medium (Material und Methoden 3.1, Tab. 5) mit den entsprechenden Antibiotika angezogen und bei einer OD_{578nm} von 0,4 bis 0,6 induziert. Anschließend wurden die Kulturen für weitere 2 bis 4 Stunden inkubiert.

6.2 Reinigung von Enzymen

Aerobe Enzymreinigungen wurden für die (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase, die 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA Dehydrogenase und Benzoylsuccinyl-CoA-Thiolase mit dem FPLC-System ÄKTApurifier™ (GE Healthcare, Freiburg) unter aeroben Bedingungen bei 4°C durchgeführt. Die Absorption des Eluates, aufgefangen in 5 ml-Fraktionen, wurde bei 280 nm über einen UV-Monitor des FPLC-Systems gemessen und das Profil aufgezeichnet. Anaerobe Enzymreinigungen wurden für die rekombinante (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase bei 4°C mit Hilfe einer Peristaltikpumpe (Heidolph, Schwabach) im Anaerobenzelt (Coy Instruments, Grass Lake, MI, USA) durchgeführt. Relevante Enzymfraktionen wurden ankonzentriert (Material und Methoden 6.3) und entweder sofort weiterverwendet oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert. Die Aktivität der Enzyme wurde nach jedem Chromatographieschritt wie in Material und Methoden 6.7.1, 6.7.2, 6.7.4 und 6.7.6 beschrieben gemessen. Desweiteren wurde die Reinigung über SDS-PAGE analysiert (Material und Methoden 6.5).

6.2.1 Reinigung der (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase

Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Sepharose. 9 ml Zellextrakt von *E. coli* mit überproduzierter (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase wurden auf eine DEAE-Sepharose-Säule (Säulenvolumen: 30 ml; GE Healthcare, Freiburg) aufgetragen, die zuvor mit Grundpuffer [10 mM Tris/HCl (pH 8,0); 2 mM MgCl₂; 10 % Glycerin (w/v)] äquilibriert

wurde. Die Säule wurde nach Auftrag des Zellextrakts mit drei Säulenvolumina Grundpuffer mit einer Flussrate von 3 ml min^{-1} gewaschen. Anschließend wurde mit einem linearen Gradienten von 0-200 mM KCl in Grundpuffer über 10 Säulenvolumen eluiert. Es wurden Fraktionen à 5 ml gesammelt. Die (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase eluierte in einem Volumen von 50 ml bei einem Salzgehalt von 75-125 mM KCl.

Chromatographie über Hydroxyapatit. Ein Drittel des Eluates (18 ml) wurde auf 50 ml mit Grundpuffer verdünnt, so dass die verbleibende Salzkonzentration in der Proteinlösung etwa 30 mM KCl betrug. Die somit teilweise entsalzte Fraktion wurde auf eine Hydroxyapatit-Säule (Säulenvolumen: 20 ml; Macro-Prep Ceramic Hydroxyapatite Typ II; Biorad, München) aufgetragen, die zuvor mit Grundpuffer [10 mM Tris/HCl (pH 7,5); 10 % (v/v) Glycerin] äquilibriert wurde. Die Säule wurde anschließend mit drei Säulenvolumina Grundpuffer und einer Flussrate von 2 ml min^{-1} gewaschen. Anschließend wurde mit einem linearen Gradienten von 0-100 mM Kaliumphosphat in Grundpuffer über 15 Säulenvolumina eluiert und das Eluat in 5ml-Fraktionen gesammelt. Die (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase eluierte in einem Volumen von 8 ml bei einer Konzentration von 30-40 mM Kaliumphosphat.

6.2.2 Reinigung der 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA Dehydrogenase

Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Sepharose. 12 ml Zellextrakt von *E. coli* mit überproduzierter 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA Dehydrogenase (15 ml) wurde auf eine mit Grundpuffer [10 mM Tris/HCl (pH 8,0); 2 mM MgCl_2 ; 10 % Glycerin(w/v)] äquilibrierte DEAE-Sepharose-Säule (Säulenvolumen: 30 ml; GE Healthcare, Freiburg) aufgetragen. Danach wurde die Säule mit fünf Säulenvolumina Grundpuffer bei einer Flussrate von 3 ml min^{-1} gewaschen und anschließend wurde mit einem linearen Gradienten von 0-150 mM KCl in Grundpuffer über 20 Säulenvolumen eluiert. Dabei wurden 5 ml-Fraktionen gesammelt. Die 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA Dehydrogenase eluierte in einem Volumen von 50 ml bei einem Salzgehalt von ca. 50-100 mM KCl.

Chromatographie über Hydroxyapatit. 16 ml des Eluates nach DEAE-Sepharose wurden mit Grundpuffer verdünnt, so dass die Salzkonzentration in der Proteinlösung etwa 30 mM KCl betrug. Diese Fraktion wurde auf eine Hydroxyapatit-Säule (Säulenvolumen: 20 ml; Macro-Prep Ceramic Hydroxyapatite Typ II; Biorad, München) aufgetragen, die zuvor

mit Grundpuffer [10 mM Tris/HCl (pH 7,5); 10 % (v/v) Glycerin] äquilibriert wurde. Nach dem Auftrag wurde die Säule mit drei Säulenvolumina Grundpuffer bei einer Flussrate von 2 ml min^{-1} gewaschen. Anschließend wurde mit einem linearen Gradienten von 0-100 mM Kaliumphosphat in Grundpuffer über 15 Säulenvolumina eluiert und das Eluat in 5 ml-Fractionen gesammelt. Die 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA Dehydrogenase eluierte in einem Volumen von 18 ml bei einer Konzentration von 30-40 mM Kaliumphosphat.

6.2.3 Reinigung der Benzoylsuccinyl-CoA-Thiolase

Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Sephrose. 12 ml Zellextrakt von *E. coli* mit überproduzierter Benzoylsuccinyl-CoA-Thiolase (BbsA und BbsB) wurde auf eine DEAE-Sephrose-Säule (Säulenvolumen: 30 ml; GE Healthcare, Freiburg) aufgetragen, die zuvor mit Grundpuffer [10 mM Tris/HCl (pH 8,0); 2 mM MgCl_2 ; 10 % Glycerin(w/v)] äquilibriert wurde. Die Säule wurde nach Auftrag des Zellextrakts mit sechs Säulenvolumina Grundpuffer bei einer Flussrate von 3 ml min^{-1} gewaschen. Anschließend wurde mit einer Stufe von 80 mM KCl in Grundpuffer über 3 Säulenvolumen eluiert. Dabei eluierten beide Untereinheiten (BbsA und BbsB) in einem Volumen von 15 ml. Anschließend wurde ein linearer Gradient von 80-200 mM KCl angelegt (5 Säulenvolumen) und in einer darauffolgenden Stufe von 300 mM KCl (3 Säulenvolumen) eluierte die kleine Untereinheit (BbsA) in einem Volumen von 25 ml. In der 500 mM-Stufe (3 Säulenvolumen) eluierte die Thiolase (BbsB) in einem Volumen von 30 ml.

Chromatographie über Hydroxyapatit. Die gesammelten Fraktionen mit BbsA und BbsB wurden separat über Chromatographie an Hydroxyapatit (Säulenvolumen: 20 ml; Macro-Prep Ceramic Hydroxyapatite Typ II; Biorad, München) weiter gereinigt. Beide Fraktionen wurden mit Grundpuffer verdünnt, so dass eine Salzkonzentration von 10-30 mM vorlag. Die Fraktionen wurde auf eine Hydroxyapatit-Säule aufgetragen, die zuvor mit Grundpuffer [10 mM Tris/HCl (pH 7,5); 10 % (v/v) Glycerin] äquilibriert wurde. Anschließend wurde die Säule mit fünf Säulenvolumina Grundpuffer und einer Flussrate von $2\text{-}3 \text{ ml min}^{-1}$ gewaschen. Eluiert wurde mit einem linearen Gradienten von 0-300 mM (BbsA) bzw. 0-400 mM (BbsB) Kaliumphosphat in Grundpuffer über 20 Säulenvolumina. Das BbsB-Protein eluierte dabei zwischen 150 und 200 mM Kaliumphosphat in einem Volumen von 15-25 ml, das BbsA-Protein zwischen 80 und 120 mM Kaliumphosphat in einem Volumen von

20-30 ml.

6.2.4 Reinigung der (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase

Die Reinigung der (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase erfolgte unter strikt anaeroben Bedingungen. Dazu wurden alle benötigten Puffer anaerobisiert und Materialien aus Kunststoff, sowie die Strep-Tactin-Superflow-Säule (Säulenvolumen: 10 ml; IBA, Göttingen), mindestens drei Tage vor der Reinigung in das Anaerobenzelt geschleust. Auf eine mit Grundpuffer [10 mM Triethanolamin (pH 8,0); 160 mM NaCl) äquilibrierte Säule wurden 10 ml Zellextrakt von *E. coli* mit überproduzierter (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase aufgetragen. Dann wurde die Säule mit 6 Säulenvolumen Grundpuffer bei einer Flussrate von 1 ml min⁻¹ gewaschen und anschließend mit 2,5 mM Desthiobiotin in Grundpuffer über 7 Säulenvolumen eluiert. Es wurden Fraktionen à 2-5 ml gesammelt und die (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase eluierte in einem Volumen von 20 ml zwischen 3 und 5 Säulenvolumen. Die Säule wurde nach der Anwendung nach der Anleitung des Herstellers mit 1 mM HABA (2-(4'-Hydroxyphenylazo)-Benzoessäure) konserviert.

6.3 Konzentrierung von Proteinlösungen

Gereinigte Proteine wurden sofort nach den jeweiligen Chromatographieschritten durch Ultrafiltration mittels "Amicon Ultra"-Filtereinheiten (Millipore, Eschborn) auf die gewünschte Proteinkonzentration konzentriert. Die Konzentrierung erfolgte jeweils durch Zentrifugation für verschiedene Zeiten bei 2500 rpm bei 4°C (Centrifuge 5804 R; Eppendorf, Hamburg).

6.4 Proteinbestimmung

Proteinbestimmungen wurden nach der Methode von Bradford et al. (1976) durchgeführt. Als Standardprotein für die Erstellung von Eichgeraden wurde Rinderserumalbumin (BSA; Sigma-Aldrich, Taufkirchen) verwendet.

6.5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen nach ihren apparenten Molekülmassen erfolgte mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (1970). Dazu wurden 0,75 mm dicke Flachgele der Größe 7 x 10 cm verwendet. Die Acrylamidkonzentration betrug im Sammelgel 4,9 % (Tab. 18). Im Trenngel variierte die Acrylamidkonzentration je nach gewünschter Auftrennung der Proteine zwischen 6 % und 15 % (Tab. 19). Die Proteinproben wurden mit 1 Volumen Probenpuffer [2 % (w/v) SDS; 0,25 mM Dithioerythritol; 0,2 M Tris/HCl (pH 6,8); 72 % (w/v) Glycerin; 0,01 % (w/v) Bromphenolblau] versetzt und für 5 Minuten auf 95°C erhitzt. Pro Geltasche wurden 5-20 µg Protein in 10-20 µl Probenvolumen aufgetragen. Als Proteinstandard wurde ein Gemisch aus folgenden Proteinen (jeweils 2 µg) eingesetzt: Phosphorylase b (97 kDa), Rinderserumalbumin (BSA, 67 kDa), Ovalbumin (45 kDa), Lactat-Dehydrogenase (34 kDa), Carboanhydrase (29 kDa) und Lysozym (14 kDa). Des Weiteren wurde der Molekularmassenstandard „Spectra EPR“ (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) verwendet. Die Elektrophorese wurde in einer „Mini-Protean“-Laufanlage (BioRad, München) für Minigele in Laufpuffer [24,8 mM Tris; 192 mM Glycin; 3,5 mM SDS] bei RT und konstant 130 V durchgeführt. Die Elektrophorese wurde beendet, sobald die Bromphenolblau-Bande das untere Ende des Trenngels erreichte.

Färben und Dokumentation von Polyacrylamidgelen. Proteine in SDS-Polyacrylamidgelen wurden mit Coomassie Brilliant Blue R-250 nach Zehr et al. (1989) detektiert. Die SDS-Polyacrylamidgele wurden für 2 Stunden in Coomassie-Färbelösung [0,25 % (w/v) Serva Blau G-250, 30 % (v/v) Methanol, 20 % (v/v) Essigsäure] inkubiert. Anschließend wurden die SDS-Polyacrylamidgele in Entfärbe-Lösung [30 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Essigsäure] inkubiert. Zur Dokumentation wurden die Gele eingescannt und zur Konservierung abschließend in einem „Slab Gel Dryer SE1160“ (Hoefer; Holliston, MA, USA) zwischen zwei Zellophanfolien getrocknet.

Tab. 18: Zusammensetzung des Sammelgels.

4,9 % Protogel-Fertiglösung (Roth, Karlsruhe)*

125 mM Tris/HCl pH 6,8

0,1 % (w/v) SDS

0,05 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfat

0,001 % (v/v) TEMED

* 30 % (w/v) Acrylamid; 0,8 % (w/v) Bisacrylamid

Tab. 19: Zusammensetzung des Trenngels.

6-15 % Protogel-Fertiglösung (Roth, Karlsruhe)*

450 mM Tris/HCl pH 8,8

0,1 % (w/v) SDS

0,05 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfat

0,001 % (v/v) TEMED

* 30 % (w/v) Acrylamid; 0,8 % (w/v) Bisacrylamid

6.6 Immunoblot

Der Elektrotransfer von Proteinen aus SDS-Polyacrylamidgelen auf Nitrocellulose (Porengröße 0,45 µm; Schleicher und Schuell, Dassel) erfolgte mit Hilfe einer Naßblot-Anlage (Mini Trans-Blot cell; BioRad, München) für 2 Stunden bei 300 mA in Transferpuffer [25 mM Tris; 192 mM Glycin; 20 % (v/v) Methanol]. Anschließend wurde die Nitrocellulose für 1 Stunde bei RT in Blockierlösung [TBS-Tween-Puffer mit 3 % (w/v) BSA oder Magermilch] inkubiert. Der TBS-Tween-Puffer enthielt 10 mM Tris/HCl (pH 7,5); 150 mM NaCl; 0,05 % Tween20. Der Nachweis von His-getagten Proteinen erfolgte durch Inkubation der Membran für 1 Stunde bei RT mit dem Penta-His-HRP-Antikörper (Qiagen, Hilden; 1:5000 verdünnt in Blockierlösung), mit dem Antikörper „Strep-Tactin conjugated to horseradish peroxidase“ (IBA, Göttingen; 1:4000 verdünnt in Blockierlösung) wurden Strep-getagte Proteine detektiert. Anschließend wurde die Nitrocellulose dreimal mit TBS-Tween-Puffer für jeweils 10 Minuten bei RT gewaschen. Dadurch wurden unspezifisch reagierende Antikörper entfernt. Die Entwicklung des Immunoblots erfolgte mit Hilfe von Super Signal-Entwicklerlösung (Pierce, Rockford, IL, USA) nach Angaben des Herstellers und

anschließender Exposition für 30 bis 60 Sekunden auf „Hyperfilm ECL“ (GE Healthcare, Freiburg).

6.7 Enzymatische Tests

6.7.1 Enzymtest zur Aktivitätsbestimmung der (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase

Die Aktivität rekombinanter (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase wurde photometrisch bei RT durch Abnahme der Absorption bei 290 nm ($A_{290\text{nm}}$) mit (*E*)-Phenylitaconyl-CoA als Substrat bestimmt. Das bei der Reaktion entstehende 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA absorbiert bei einer Wellenlänge von 290 nm nicht, da die dafür verantwortliche Doppelbindung durch die Anlagerung eines Wassermoleküls verschwindet. Nach dem gleichen Prinzip wurde die Aktivität der (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase mit (*E*)-Phenylitaconyl-*N*-Acetylcysteamin als alternativem Substrat bestimmt. Der Extinktionskoeffizient bei 290 nm von (*E*)-Phenylitaconyl-CoA bzw. (*E*)-Phenylitaconyl-*N*-Acetylcysteamin wurde experimentell zu $5800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ bzw. $7230 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ bestimmt, indem die Absorption genau eingewogener Mengen bei einer Wellenlänge von 290 nm gemessen wurden. Der Testansatz für die Messungen im SpectraPhotometer (GE Healthcare, Freiburg) enthielt in 0,5 bis 1 ml Gesamtvolumen 10 μl entsprechend verdünnte Proteinelösung, 150 bis 200 μM (*E*)-Phenylitaconyl-CoA bzw. (*E*)-Phenylitaconyl-*N*-Acetylcysteamin in 50 mM MES/NaOH (pH 6,2). Die Bestimmung von pH-Optima wurden im Bereich von pH 5,8 bis pH 6,5 mit 50 mM MES/NaOH, von pH 6,6 bis pH 7,5 mit 50 mM MOPS/NaOH durchgeführt. Die Reaktion wurde bei RT durch Zugabe von (*E*)-Phenylitaconyl-CoA bzw. (*E*)-Phenylitaconyl-*N*-Acetylcysteamin gestartet und die $A_{290\text{nm}}$ verfolgt. Zur Trennung und Detektion von Substraten und Produkten wurden die Reaktionsansätze über RP-HPLC (Material und Methoden 6.7.5) analysiert.

6.7.2 Enzymtest zur Aktivitätsbestimmung der 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA Dehydrogenase

Das Substrat der 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA Dehydrogenase ist kommerziell oder durch einfache chemische Synthese nicht zugänglich. Deshalb wurde die Oxidation von

2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA in einem gekoppelten Enzymtest mit der (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase und (*E*)-Phenylitaconyl-CoA als Substrat ermittelt. Zur Bestimmung der Aktivität der 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA Dehydrogenase wurde dabei die Zunahme der Absorption bei 365 nm ($A_{365\text{nm}}$) durch die Reduktion von NAD (ϵ : $3400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) gemessen. Der Testansatz enthielt in 0,5 bis 1 ml 150 bis 200 μM NAD als Elektronenakzeptor, 150 bis 200 μM (*E*)-Phenylitaconyl-CoA, 10 μl angereicherte (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase und 0,1 bis 0,5 mg gereinigte 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA Dehydrogenase in 50 mM MES/NaOH (pH 6,2). Die Bestimmung von pH-Optima wurden im Bereich von pH 5,8 bis pH 6,5 mit 50 mM MES/NaOH, von pH 6,6 bis pH 7,5 mit 50 mM MOPS/NaOH durchgeführt. Die Reaktion wurde bei RT durch Zugabe von (*E*)-Phenylitaconyl-CoA gestartet und die Absorptionsänderung bei $A_{365\text{nm}}$ in einem Photometer (SpectraPhotometer; GE Healthcare, Freiburg) verfolgt. Durch Zugabe von 500-750 μM Phenylhydrazin zum Testansatz sollte das durch die 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA Dehydrogenase gebildete Keton Benzoylsuccinyl-CoA in Form eines Phenylhydrazons abgefangen werden. Zur Trennung und Detektion von Substraten und Produkten wurden die beschriebenen Reaktionsansätze über RP-HPLC (Material und Methoden 6.7.5) analysiert.

6.7.3 Enzymtest zur Aktivitätsbestimmung der 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA Dehydrogenase mit alternativen Substraten

Die Aktivität der 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA Dehydrogenase in der Rückreaktion wurde durch die Reduktion alternativer Substrate (Acetophenon, 2,2- und 2,*p*-Dichloracetophenon) gemessen. Dabei wurde die Abnahme der Absorption bei 365 nm ($A_{365\text{nm}}$) durch die Oxidation von NADH gemessen (ϵ : $3400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Der Testansatz enthielt in 0,5 bis 1 ml Gesamtvolumen 350-500 μM NADH als Elektronendonator, 350-500 μM des jeweiligen alternativen Substrates und 0,1 bis 0,5 mg gereinigte 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA Dehydrogenase in 50 mM MES/NaOH (pH 6,2). Die Reaktion wurde bei RT durch Zugabe des jeweiligen Substrates gestartet und die Absorptionsänderung bei $A_{365\text{nm}}$ in einem Photometer (SpectraPhotometer; GE Healthcare, Freiburg) verfolgt.

6.7.4 Enzymtest zur Aktivitätsbestimmung der Aktivität der Benzoylsuccinyl-CoA-Thiolase

Das Substrat der Benzoylsuccinyl-CoA-Thiolase ist weder kommerziell noch über einfache chemische Synthese erhältlich. Daher wurde die Aktivität der Benzoylsuccinyl-CoA-Thiolase über die Rückreaktion in Gegenwart von Phenylhydrazin photometrisch bei RT durch Zunahme der Absorption bei 312 nm ($A_{312\text{nm}}$) bestimmt. Das durch die Kondensation von Benzoyl-CoA und Succinyl-CoA entstehende Benzoylsuccinyl-CoA bildet in Gegenwart von Phenylhydrazin ein Hydrazon, das eine spezifische Absorption bei einer Wellenlänge von 312 nm aufweist. Basierend auf der Differenz der Absorption des Hydrazons im Vergleich zu Benzoyl-CoA bei 312 nm und unter der Annahme, dass die Absorption des Hydrazons bei 260 nm identisch zu der von Benzoyl-CoA ($21100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; Webster et al., 1974) ist, wurde für das Hydrazon ein Extinktionskoeffizient ϵ von $6300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ bestimmt. Die Testansätze für die Messungen im Photometer (SpectraPhotometer; GE Healthcare, Freiburg) enthielten in 0,5 bis 1 ml Gesamtvolumen jeweils 10 μl gereinigtes Protein (mindestens 0,1 mg BbsA bzw. BbsB), 250-500 μM Benzoyl-CoA bzw. Succinyl-CoA und 750 μM Phenylhydrazin in 50 mM MES/NaOH (pH 6,2). Die Reaktion wurde durch Zugabe eines Benzoyl-CoA/Succinyl-CoA-Gemisches gestartet und die $A_{312\text{nm}}$ verfolgt. Zur Trennung und Detektion von Substraten und Produkten wurden die beschriebenen Ansätze über RP-HPLC (Material und Methoden 6.7.5) analysiert. Des Weiteren wurden identische Ansätze ohne Phenylhydrazin auf eine mögliche Produktbildung untersucht.

6.7.5 Produkt-Analyse über RP-HPLC

Zur Trennung und Identifizierung von Substraten und Produkten der von gereinigter (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase, 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA Dehydrogenase und Benzoylsuccinyl-CoA-Thiolase katalysierten Reaktionen wurden die in Material und Methoden 6.7.1, 6.7.2 und 6.7.4 beschriebenen Reaktionsansätze über RP-HPLC analysiert. Aus den Reaktionsansätzen wurden nach verschiedenen Zeitpunkten (0-60 Minuten) Proben von 0,1 bis 0,2 ml entnommen und die Reaktion zur Analyse der Substrate bzw. der entstandenen Produkte durch Zugabe von 10 % (v/v) NaHSO_4 gestoppt. Ausgefallenes Protein wurde abzentrifugiert (13200 rpm, 10 Minuten, 4°C), die Überstände mittels RP-HPLC aufgetrennt und auf Produktbildung untersucht (Material und Methoden 8.1).

6.7.6 Enzymtests zur Bestimmung der Aktivierbarkeit rekombinanter (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase

Produkt-Analyse über RP-HPLC. Die Überprüfung der Aktivierbarkeit gereinigter rekombinanter (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase erfolgte nach einem Protokoll von C. Feil (2006) durch Detektion des Produkts (*R*)-Benzylsuccinat via RP-HPLC. Der Testansatz wurde im Anaerobenzelt angesetzt und enthielt in einem Gesamtvolumen von 250 µl bis 1 ml folgende Komponenten: 10 mM Fumarat, 5 mM Toluol, 2 mM (NH₄)₂SO₄, 0,4 mM MgCl₂, 2-14 mM Na-Dithionit, 0,2 mM *S*-Adenosylmethionin (SAM), 100 mM Tris/HCl (pH 7,5), 1-4 mM Titancitrat, mit Luftsauerstoff inaktivierte Zellextrakte von *T. aromatica* bzw. *Azoarcus* sp. Stamm T (20 bis 30 mg ml⁻¹), sowie *E. coli*-Rohextrakt mit überproduziertem aktivierendem Enzym (30 mg ml⁻¹) und gereinigte (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase (30-50 µg). Alle dazu benötigten Stocklösungen und Puffer wurden zuvor anaerobisiert. Nach verschiedenen Zeitpunkten (0 bis 90 Minuten) wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 % (v/v) NaHSO₄ gestoppt, die Ansätze aus dem Anaerobenzelt geschleust und die Säurepräzipitierten Proteine wurden durch Zentrifugation (13200 rpm, 10 Minuten) abgetrennt. Der Überstand wurde mittels RP-HPLC auf Produktbildung untersucht (Material und Methoden 8.1).

Qualitative Bestimmung mittels Western Blot. Aktivierter rekombinante (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase sollte wie das native Enzym ein Glycylradikal enthalten und bei Inkubation mit Sauerstoff oxygenolytisch gespalten werden. Mit Antikörpern gegen den am N-Terminus der α -Untereinheit der rekombinanten (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase lokalisierten Strep-Tag sollten sich sowohl ungespaltene (inaktives Enzym) wie auch oxygenolytisch gespaltene α -Untereinheiten (aktiviertes Enzym) mittels Western-Blot detektieren lassen. Daher wurden die oben beschriebenen Aktivierungsansätze nach Reaktionsende nicht mit Säure gefällt, sondern aus dem Anaerobenzelt geschleust und für etwa 10 Minuten an Luft inkubiert. Dadurch wird aktivierte (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase oxygenolytisch gespalten. Die Reaktionsansätze wurden auf ein 6%iges oder 7%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen (10 µg bis 20 µg Protein) und anschließend wurde eine Western-Blot-Analyse durchgeführt (Material und Methoden 6.5 und 6.6). Des Weiteren wurden für die qualitative Bestimmung auch nicht-inaktivierte Zellextrakte von *T. aromatica* bzw. *Azoarcus* sp. Stamm T in den oben beschriebenen Aktivierungsansätzen eingesetzt.

6.7.7 Enzymtest zur Aktivitätsbestimmung der (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase im Rohextrakten von *T. aromatica* und *Azoarcus* sp. Stamm T

Die Bestimmung der Aktivität der (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase in Zellextrakten von auf Toluol kultivierten Zellen von *T. aromatica* bzw. *Azoarcus* sp. Stamm T (Material und Methoden 4.4) erfolgte durch den Nachweis von (*R*)-Benzylsuccinat mittels RP-HPLC. Alle dazu benötigten Stocklösungen wurden zuvor anaerobisiert. Der Testansatz mit einem Gesamtvolumen von 1 bis 2 ml wurde im Anaerobenzelt angesetzt und enthielt Rohextrakte von *T. aromatica* bzw. *Azoarcus* sp. Stamm T (35-45 mg ml⁻¹), 2-5 mM Toluol (bzw. *o*-, *m*- und *o*-Cresol, *o*-, *m*-, *p*-Xylol, *o*-Toluidin als alternative Substrate) und 2-5 mM Natriumfumarat in 10 mM TEA/NaOH (pH 7,5). Nach verschiedenen Zeiten (0 bis 60 Minuten) wurden Proben (0,1-0,2 ml) entnommen und die Reaktion durch Zugabe von 10 % (v/v) NaHSO₄ gestoppt. Anschließend wurden die Ansätze aus dem Anaerobenzelt geschleust und Säurepräzipitierte Proteine durch Zentrifugation (13.200 rpm, 10 Minuten, 4°C) abgetrennt. Die Überstände wurden mittels RP-HPLC auf Produktbildung untersucht (Material und Methoden 8.1).

6.8 Methoden zur Enzymkinetik

6.8.1 Bestimmung von apparenten K_m -Werten und V_{max}

Die Bestimmung der apparenten K_m - und V_{max} -Werte gereinigter (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase bzw. 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA Dehydrogenase für die jeweiligen Substrate erfolgte mit denen in Material und Methoden 6.7.1, 6.7.2 und 6.7.3 beschriebenen photometrischen Standardtests zur Ermittlung der Enzymaktivitäten. Die Aktivitäten wurden dazu bei Substratkonzentrationen von 25 µM bis 500 µM gemessen. Durch Anpassung der experimentellen Daten an die Hill- bzw. Michaelis-Menten-Gleichung mit Hilfe des Graphikprogramms Prism4.0 (GraphPad Software; La Jolla, CA, USA) wurden die jeweiligen apparenten K_m -Werte und V_{max} ermittelt.

Die Bestimmung der K_m - und V_{max} -Werte für beide Substrate der Benzoylsuccinyl-CoA-Thiolase (BbsAB) erfolgte über den photometrischen Standardtest (Material und Methoden 6.7.4). Dazu wurden die Aktivitäten bei konstanten Konzentrationen von Benzoyl-CoA

(50 μM , 100 μM und 250 μM) und variierten Konzentrationen von Succinyl-CoA (50 μM - 500 μM) gemessen. In weiteren Ansätzen wurden auch die Konzentrationen von Benzoyl-CoA bei konstanten Konzentrationen von Succinyl-CoA variiert. Die Ermittlung der jeweiligen K_m - und V_{max} -Werte erfolgte durch Anpassung der experimentellen Daten an die Formeln der Zwei-Substrat-Kinetik nach einem Ping-Pong- bzw. Ternärkomplex-Mechanismus mit dem Programm Leonora (Version 1.0; steady-state Enzyme Kinetics on the IBM® PC and Compatibles; Cornish-Bowden, 1995; Oxford University Press) und wird in der Diskussion (1.3) näher dargestellt.

6.9. Methoden zur Bestimmung apparenter Molekülmassen

6.9.1 Gelfiltration

Gelfiltrationen zur Bestimmung der nativen Molekülmassen von Proteinen erfolgten mit dem FPLC-System ÄKTApurifier™ (GE Healthcare, Freiburg) über eine “Superdex200 High Load“-Gelfiltrationssäule (Säulenvolumen: 320 ml; GE Healthcare, Freiburg). Pro Lauf wurde die Säule mit 300-500 μg Protein in einem Gesamtvolumen von maximal 300 μl beladen. Der Säulenlauf erfolgte mit Gelfiltrationspuffer [50 mM Tris/HCl (pH 7,5); 10% Glycerin (v/v); 0,5 M NaCl] bei einer Flussrate von 0,2 ml min⁻¹. Die gesammelten Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE (Material und Methoden 5.4) analysiert. Zur Eichung der Säule wurde Katalase (240 kDa), Aldolase (160 kDa), Rinderserumalbumin (BSA, 67 kDa), Ovalbumin (45 kDa), Lactat-Dehydrogenase (34 kDa) und Lysozym (14 kDa) verwendet. Die Bestimmung des Molekulargewichtes erfolgte über Berechnung des Wertes K_{AV} (Gleichung 1). Das Ausschlußvolumen V_a der Säule wurde mit Dextranblau (Sigma, Deisenhofen) und das Einschlussvolumen mit Vitamin B12 (Sigma, Deisenhofen) bestimmt. Die ermittelten K_{AV} -Werte wurden gegen den Logarithmus der Molekulargewichte (kDa) der Eichproteine aufgetragen und somit konnte das Molekulargewicht der jeweiligen Proteine anhand der erstellten Eichgerade abgelesen werden.

$$K_{AV} = \frac{V_e - V_a}{V_t - V_a}$$

Gleichung 1: Gleichung zur Berechnung des K_{AV} -Wertes. V_e ist als das Elutionsvolumen der Eichproteine bzw. des zu untersuchenden Proteins, V_a als das Ausschlußvolumen der Säule und V_t als das Einschlussvolumen der Säule definiert.

6.9.2 Native Polyacrylamidgele und Ferguson-Analyse

Als Alternative zur Bestimmung des nativen Molekulgewichts durch Gelfiltration wurde eine Ferguson-Plot-Analyse nativer Polyacrylamidgele durchgeführt (Ferguson, 1964). Dazu wurde das gereinigte Protein durch Nativgelelektrophorese in Polyacrylamidgelen mit verschiedenen Konzentrationen an Acrylamid (6 % bis 10 %) aufgetrennt (Tab. 20). Die Proteinproben (5-20 µg Protein in 10-20 µl Probenvolumen) wurden im Verhältnis 1:1 mit Nativ-Gel Probenpuffer [50 mM Tris/HCl (pH 6,8); 10 % Glycerin (w/v); 5 % (w/v); 0,025 % (w/v) Bromphenolblau] versetzt. Als Massenstandards dienten dabei Ovalbumin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) und Rinderserumalbumin (BSA; Sigma-Aldrich, Taufkirchen), die in denselben Gelen aufgetrennt wurden (jeweils 5 µg/Tasche). Die Elektrophorese wurde in einer "Mini-Protean"-Laufanlage (BioRad) für Minigele in Nativgel-Laufpuffer [24,8 mM Tris; 192 mM Glycin] bei RT und 130 V durchgeführt. Die Elektrophorese wurde beendet, sobald die Bromphenolblau-Bande das untere Ende des Trenngels erreichte. Die Nativgele Gele wurden, wie für SDS-Polyacrylamidgele in Material und Methoden 6.5 beschrieben, gefärbt und getrocknet.

Zur Ermittlung der nativen Molekülmassen (Ferguson-Analyse) wurden zunächst die Logarithmen der relativen Laufstrecken (R_f) gegen die jeweilige Gelkonzentration aufgetragen und Ausgleichsgeraden berechnet. Aus den Logarithmen der Beträge der Steigungen der einzelnen Geraden (k) und den Logarithmen der Molekülmassen der Standardproteine wurde anschließend eine Eichgerade erstellt. Daraus wurde die Molekülmasse der jeweiligen Proteine abgelesen.

Tab. 20: Zusammensetzung des Nativgels.

6-10 % Protogel-Fertiglösung (Roth, Karlsruhe)*

125 mM Tris/HCl pH 8,8

0,05 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfat

0,001 % (v/v) TEMED

* 30 % (w/v) Acrylamid; 0,8 % (w/v) Bisacrylamid

7. Chemische Arbeitsmethoden

7.1 Synthese von (*E*)-Phenylitaconat

Die Synthese von (*E*)-Phenylitaconat (Benzylidensuccinat) erfolgte analog dem Protokoll von Ravina et al. (2002) und ist in Abb. 5 dargestellt. Eine Lösung aus 35 mmol (3,8 g) Benzaldehyd und 44 mmol (6,4 g) Dimethylsuccinat in 5 ml *tert*-Butanol wurde über 4 h tropfenweise einer Mischung aus 39 mmol (4,3 g) K-*tert*-Butanolat in 25 ml *tert*-Butanol zugegeben, die unter Reflux gekocht wurde. Die Rücklaufkühlung wurde drei weitere Stunden fortgesetzt, anschließend wurde das Lösungsmittel *t*-Butanol mit Hilfe eines Rotationsverdampfers abgedampft. Der erhaltene Niederschlag wurde in 25 ml 1 N wässriger HCl gelöst, und die Lösung wurde dreimal mit Ethylacetat (je 25 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Na₂SO₄ getrocknet und zu einem öligen Extrakt einrotiert. Dieses Öl wurde in Methanol (15 ml) gelöst, anschließend wurden 25 ml einer 15 %igen Lösung von NaOH in Methanol zugegeben und die Mischung für 12 Stunden unter Rücklaufkühlung gekocht. Die erhaltene Suspension wurde einrotiert und in Wasser (38 ml)

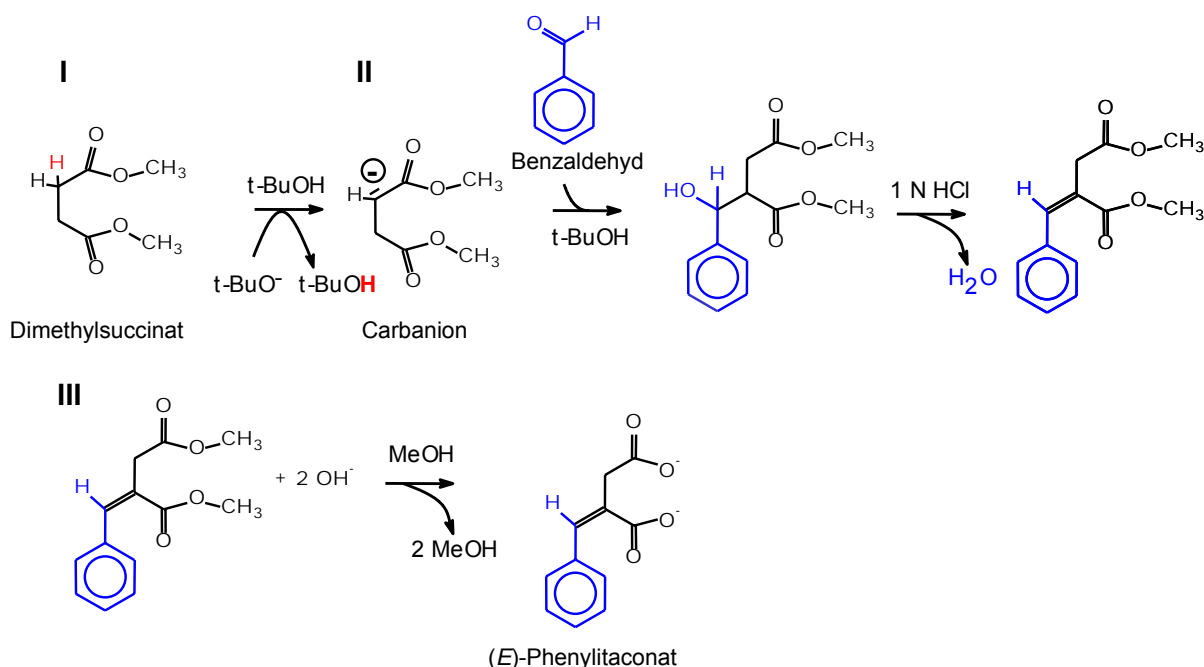


Abb. 5: Prinzip der Synthese von (*E*)-Phenylitaconat (nach Ravina et al., 2002). **I:** *t* Butanolat (*t*-BuOH) greift das azide Wasserstoffatom von Dimethylsuccinat nukleophil an und abstrahiert ein Proton. **II:** Das entstandene Carbanion greift das elektrophile Kohlenstoffatom des Benzaldehyds nukleophil an und addiert kovalent. Anschließend wird die Hydroxygruppe am β -C-Atom des Intermediates durch saure Hydrolyse eliminiert. **III:** Die Methylschutzgruppen (MeOH) der Carboxylgruppen werden durch alkalische Hydrolyse abgespalten.

aufgenommen. Die wässrige Lösung wurde dreimal mit Ethylacetat (je 25 ml) gewaschen, mit konzentrierter HCl auf pH 3,0 angesäuert und anschließend wieder dreimal mit Ethylacetat (je 25 ml) extrahiert. Die organischen Phasen wurden mit Na₂SO₄ getrocknet und mittels eines Rotationsverdampfers 6 bis 9fach ankonzentriert. Aus dieser Lösung wurde (*E*)-Phenylitaconat durch Zugabe eines Gemischs von Ethylacetat und Hexan weißer Feststoff auskristallisiert und in einer Fritsche von der Flüssigkeit getrennt. (*E*)-Phenylitaconat wurde bei 55°C bis 60°C im Trockenschrank getrocknet und anschließend mittels RP-HPLC auf Reinheit untersucht (Material und Methoden 8.1). (*E*)-Phenylitaconat wurde bis zur weiteren Verwendung auf Trockenperlen bei -80°C gelagert.

7.2 Synthese von CoA-Thioestern

Die CoA-Thioester (*E*)-Phenylitaconyl-CoA, Benzoyl-CoA und Succinyl-CoA wurden über die jeweiligen Anhydride der freien Säuren hergestellt (Schachter und Taggart, 1976). Die Anhydride der (*E*)-Phenylitaconsäure, Succinat bzw. Benzoat waren kommerziell nicht erhältlich und wurden daher aus den jeweiligen freien Säuren und Essigsäureanhydrid hergestellt: Dazu wurden 384 µmol der Säure in 800 µl Essigsäure bei 80°C gelöst, anschließend wurden 384 µmol (37 µl) Essigsäureanhydrid zugegeben. Der Reaktionsansatz wurde so lange bei 120°C inkubiert, bis das Lösungsmittel Essigsäure sowie die Essigsäure, die aus dem Essigsäureanhydrid freigesetzt wurde, komplett verdampft waren (Siedepunkte: Essigsäure: 118,2°C, Essigsäureanhydrid: 139,0°C; Dawson et al., 1986). Man erhielt das Anhydrid der jeweiligen freien Säure, das bei 120°C flüssig war und bei Abkühlung auf Raumtemperatur fest wurde. Für die Synthese der CoA-Thioester wurden in einem Anaerobenzelt 120 µmol CoA (Tri-Lithium-Salz) und 384 µmol des gemörserten Anhydrids in 10 ml anaerobisiertem 100 mM Natriumhydrogencarbonat-Puffer (pH 7,5) gelöst. Die Ansätze wurden für 3 bis 4 Stunden auf Eis gerührt. Dabei wurde stets der pH-Wert kontrolliert und bei Bedarf durch Zugabe von 100 bis 500 µl 0,1 M Natriumhydrogencarbonat-Lösung auf pH 8,0 eingestellt. Die Reaktionen wurden durch den Nachweis freier Thiol-Gruppen mit dem Nitroprussid-Test (Material und Methoden 8.2) auf Vollständigkeit überprüft. Nach Ablauf der Reaktionen wurden die Ansätze mit 1 M HCl-Lösung auf einen pH-Wert von pH 2,5 bis pH 3,0 eingestellt. Die übrig gebliebenen protonierten organischen Säuren wurden jeweils dreimal mit je 30 ml Dimethylether ausgeschüttelt. Die wässrigen, CoA-Thioester enthaltenden Phasen wurden lyophilisiert und

der Rückstand mittels RP-HPLC auf Reinheit untersucht (Material und Methoden 8.1). Die CoA-Thioester wurden bis zur weiteren Verwendung auf Trockenperlen bei -80°C gelagert. Bei Lagerung über drei Monate hinaus wurde eine Hydrolyse zu freiem CoA und den jeweiligen Säuren beobachtet.

7.3 Synthese von (*E*)-Phenylitaconyl-*N*-Acetylcysteamin

Die Synthese von (*E*)-Phenylitaconyl-*N*-Acetylcysteamin erfolgte analog zu der Synthese von CoA-Thioestern über das Anhydrid des (*E*)-Phenylitaconats und anschließender Thioesterbindung mit *N*-Acetylcysteamin (Material und Methoden 7.2). Das Syntheseprodukt wurde mittels RP-HPLC auf Reinheit untersucht (Material und Methoden 8.1). Die Ausbeute der Synthese lag bei 60 %. (*E*)-Phenylitaconyl-*N*-Acetylcysteamin wurde bis zur weiteren Verwendung auf Trockenperlen bei -80°C gelagert. Zur Bestimmung der Stabilität des Syntheseproduktes bei verschiedenen pH-Werten wurden definierte Mengen in Puffer mit pH-Werten von pH 5,9 bis pH 7,5 (im Bereich von pH 5,8 bis pH 6,5 mit 50 mM MES/NaOH, von pH 6,6 bis pH 7,5 mit 50 mM MOPS/NaOH) gelöst, für ein bis zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend über RP-HPLC analysiert (Material und Methoden 8.1).

8. Analytische Methoden

8.1 Reversed-phase Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (RP-HPLC)

Die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie wurde eingesetzt, um Substrate und Produkte des anaeroben Toluolstoffwechsels zu trennen und zu identifizieren. Dazu wurde das HPLC-System „LaChrom Elite®“ mit einem gekoppelten Dioden-Array-Detektor L-2455 (VWR-Hitachi, VWR, Darmstadt) verwendet. Die Auftrennung der Substanzen erfolgte über eine RP-C18-Säule (Chromolith® Performance RP18 endcapped, 100 x 4,6 mm; Merck, Darmstadt). Die Auftrennung der freien aromatischen Säuren (*R*)-Benzylsuccinat, der (*R*)-Benzylsuccinat-Addukte und (*E*)-Phenylitaconat erfolgte unter isokratischen Bedingungen mit einer Pufferzusammensetzung von 20 % Acetonitril und 32 mM Ameisensäure (pH 3,0) und Detektion bei 220 nm. CoA-Thioester bzw. (*E*)-Phenylitaconyl-*N*-Acetylcysteamin wurden

über einem Acetonitrilgradienten von 3 bis 20 % Acetonitril in 50 mM MES/NaOH (pH 6,2) über 20 bis 30 Minuten aufgetrennt. Die Elutionszeiten der untersuchten Verbindungen unter den beschriebenen Bedingungen sind in Tabelle 21 aufgelistet. Die Detektion erfolgte bei einer Wellenlänge von 260 nm. Die Flussrate variierte bei den beschriebenen Läufen zwischen 1 und 5 ml min⁻¹. Die UV/Vis-Spektren der Substanzen wurden während des Laufes mit Hilfe des Dioden-Array-Detektors aufgenommen. Die bei der RP-HPLC eingesetzten Puffer wurden alle vor Verwendung durch einen 0,2 µm-Filter filtriert, um Schwebepartikel zu entfernen. Proteinhaltige Proben wurden wie folgt für die RP-HPLC-Analyse vorbereitet: Nach Zugabe von 10 % (v/v) NaHSO₄ wurde das präzipitierte Protein durch Zentrifugation (10 Minuten, 13200 rpm, 4°C) sedimentiert, der Überstand vorsichtig abgenommen und über

Tab. 21: Elutionszeiten untersuchter Intermediate des Toluolstoffwechsels und Syntheseprodukten auf einer RP-C18-Säule (Chromolith® Performance RP18 endcapped, 100 x 4,6 mm; Merck, Darmstadt) unter verschiedenen Laufbedingungen.

Verbindung	Elutionszeit [Minuten]	Laufbedingung
(<i>R</i>)-Benzylsuccinat	6-7	isokratisch
(<i>E</i>)-Phenylitaconat	8-9	isokratisch
Benzoyl-CoA	17	Acetonitril-Gradient
Benzoylsuccinyl-CoA	6-7	Acetonitril-Gradient
Benzoylsuccinyl-CoA-Hydrazon	22	Acetonitril-Gradient
2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA	3	Acetonitril-Gradient
1-(<i>E</i>)-Phenylitaconyl-CoA	2,5	Acetonitril-Gradient
4-(<i>E</i>)-Phenylitaconyl-CoA	3,5-4	Acetonitril-Gradient
(<i>E</i>)-Phenylitaconyl- <i>N</i> -Acetylcysteamin	4,5	Acetonitril-Gradient
Succinyl-CoA	3	Acetonitril-Gradient
<i>N</i> -Acetylcysteamin	3,5	Acetonitril-Gradient
Freies CoA	1,5-2	Acetonitril-Gradient
Phenylhydrazin	2	Acetonitril-Gradient
Fumarat	1-1,5	isokratisch
Toluol	2	isokratisch
<i>o</i> -Toluidin	2	isokratisch
2-Aminobenzylsuccinat	8	isokratisch

einen Spritzenfilter (0,2 µm x 4mm, vds-optilab, Berlin) filtriert. Anschließend wurden mindestens 100 µl in ein HPLC-Röhrchen überführt und mittels RP-HPLC analysiert.

8.2 Nachweis freier Thiolgruppen

Die Synthesen von CoA-Thioestern wurden mit einem kolorimetrischen Schnelltest nach Stadtman (1959) überprüft. Folgende Lösungen wurden dafür eingesetzt: Nitroprussid-Reagenz (110 ml): 1,5 g Na-Nitroprussid wurden in 5 ml 2 M H₂SO₄ gelöst, mit Methanol auf 100 ml aufgefüllt und 10 ml 30 %ige Ammoniaklösung zugegeben. Der Niederschlag wurde abfiltriert und das klare, orangefarbene Reagenz bei 4°C lichtgeschützt gelagert. Hydrolysereagenz (100 ml): 5 g NaOH wurden in 5 ml H₂O gelöst und mit Methanol auf 100 ml aufgefüllt. Zum Nachweis von CoA-Thioestern wurde ein Tropfen (5-10 µl) der zu untersuchenden Probe auf Filterpapier (Whatman-Papier, 3 mm) getropft. Darauf wurde ein Tropfen Nitroprussid-Reagenz gegeben. Nitroprussid reagiert mit freien SH-Gruppen unter intensiver Rotfärbung. War die Synthese des CoA-Thioesters abgeschlossen, blieb das Reagenz farblos. Durch Zugabe von einem Tropfen Hydrolyse-Reagenz hydrolysierten die CoA-Thioester und führten zusammen mit dem Nitroprussid-Reagenz zur Rotfärbung.

8.3 Nachweis von Zink

Der Zinkgehalt der kleinen Untereinheit BbsA wurde nach einem modifizierten Protokoll von Ghasemi et al. (2003) mit Zincon (2-Carboxy-2'-hydroxy-5'-sulfoformazylden-Natriumsalz) bestimmt. Zincon bildet mit Zink-Ionen einen blauen Farbkomplex, dessen Intensität bei einer Wellenlänge von 620 nm photometrisch gemessen wird. Dazu wurde eine Eichgerade mit einer Zn(SO)₄-Lösung im Bereich von 0 bis 500 µM hergestellt (jeweils 250 bis 500 µl). Die Konzentration der Proteinlösung wurde in Anlehnung an die Eichreihe gewählt. Zur Extraktion der Zink-Ionen aus der kleinen Untereinheit der Benzoylsuccinyl-CoA-Thiolase BbsA wurde eine saure Proteinfällung durchgeführt (Yamamoto und Ljungdahl, 1983). Je 100 µl gereinigtes Protein wurden mit 5 µl einer 0,02 M HCl-Lösung auf einen pH-Wert von pH 2,5 eingestellt. Das Gemisch wurde dann für 30 Minuten bei 95°C inkubiert (Thermoblock; Eppendorf, Hamburg) und das Protein anschließend durch Zentrifugation (13.200 rpm, 10 Minuten) sedimentiert. Der pH-Wert des Überstandes wurde

mit 100 mM NaOH auf pH 8,5 bis pH 9,0 titriert. Anschließend wurde der Überstand (250 bis 500 μ l) und die vorbereitete Eichreihe mit jeweils 250 bis 500 μ l Zincon-Stocklösung (1 mM) versetzt und die $A_{620\text{nm}}$ in einem SpectraPhotometer (GE Healthcare, Freiburg) gemessen.

9. Spektroskopische Methoden

9.1 UV/Vis-Spektroskopie

UV/Vis-Absorptionsspektren wurden mit einem "SpectraPhotometer" (GE Healthcare, Freiburg) aufgenommen. Gereinigte Enzyme wurden über einen Bereich von 200 bis 800 nm gescannt. Die Aufnahme der Spektren wurde in Quarzküvetten durchgeführt. Die Spektren wurden gegen den entsprechenden Puffer aufgenommen, in dem das Enzym vorlag.

9.2 Massenspektroskopische Methoden

Die massenspektroskopischen Untersuchungen wurden von Frau C. Rudolph aus der Arbeitsgruppe von Prof. J. J. Veith (Celmens-Schöpf-Institut für organische Chemie und Biochemie, TU Darmstadt) durchgeführt. Zur Identifizierung von Produkten enzymatischer Katalysen wurden Massenspektren mit einem Finnigan MAT IonTrap700-Massenspektrometer mit Elektrospray-Interface aufgenommen, das an ein HPLC-System mit einer Reprosil C18-Säule (vds optilab, Berlin) gekoppelt war. Aus den Reaktionsansätzen (Material und Methoden 6.7.1) wurden nach verschiedenen Zeitpunkten (10-40 Minuten) Proben von 0,1 bis 0,2 ml entnommen und die Reaktionen wurden durch Zugabe von 10 % (v/v) NaHSO_4 gestoppt. Ausgefallenes Protein wurde abzentrifugiert (13200 rpm, 10 Minuten, 4°C) und die Überstände direkt in das Massenspektrometer eingespritzt. Die Trennung der Verbindungen erfolgte über einen Gradienten von 0-20 % Acetonitril in 50 mM MES/NaOH (pH 6,2) in 20 Minuten.

IV. Ergebnisse

1. Enzyme der β -Oxidation von (*R*)-Benzylsuccinat

Das erste Intermediat im anaeroben Stoffwechsel von Toluol, (*R*)-Benzylsuccinat, entsteht durch die Addition der Methylgruppe von Toluol an die Doppelbindung von Fumarat. Diese Reaktion wird von der (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase katalysiert, einem Glycyl-Radikalenzym. (*R*)-Benzylsuccinat wird durch eine Succinyl-CoA-abhängige CoA-Transferase (BbsEF) zum CoA-Thioester aktiviert, der dann durch eine Benzylsuccinyl-CoA-Dehydrogenase (BbsG) zu (*E*)-Phenylitaconyl-CoA oxidiert wird (Leutwein und Heider, 2002; Leutwein und Heider, 2001; Leutwein und Heider, 1999). Anschließend wird (*E*)-Phenylitaconyl-CoA durch das Genprodukt von *bbsH*, welches große Sequenzähnlichkeiten zu Enoyl-CoA-Hydratasen aufweist, zu 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA hydratisiert (C. Feil, 2006). Die Enzyme, die das Intermediat 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA weiter zu Benzoyl-CoA und Succinyl-CoA umsetzen, waren zu Beginn dieser Arbeit nicht charakterisiert. Im *bbs*-Operon sind allerdings weitere Gene vorhanden, deren Produkte jeweils große Sequenzähnlichkeiten zu bekannten Alkohol-Dehydrogenasen und β -Ketothiolasen haben (Leutwein und Heider, 1999). Analog zur bekannten β -Oxidation von Fettsäuren wird daher vermutet, dass 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA durch das *bbsCD*-Genprodukt in einer NAD-abhängigen Reaktion zu Benzoylsuccinyl-CoA oxidiert und im letzten Schritt durch eine β -Ketothiolase (BbsB) thiolytisch gespalten wird.

In dieser Arbeit wurden die Enzyme biochemisch charakterisiert, welche die Umsetzung von (*E*)-Phenylitaconyl-CoA zu Benzoyl-CoA und Succinyl-CoA katalysieren, nämlich die (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase (BbsH), die 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA Dehydrogenase (BbsCD) und die Benzoylsuccinyl-CoA-Thiolase (BbsB).

1.1 Reinigung und Charakterisierung der (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase

1.1.1 Chemische Synthese von (*E*)-Phenylitaconyl-CoA

Das Substrat der (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase, (*E*)-Phenylitaconyl-CoA, wurde bereits von C. Feil (2006) synthetisiert. In dieser Arbeit wurde das Synthese-Protokoll weiter ausgearbeitet und optimiert. Zunächst wurde (*E*)-Phenylitaconat aus Benzaldehyd und Dimethylsuccinat synthetisiert (Material und Methoden 7.1). Anschließend wurde die erhaltene freie Säure in das Säureanhydrid überführt und über ein modifiziertes Protokoll von Schachter und Taggart (1976) zum CoA-Thioester umgesetzt, der schließlich über RP-HPLC gereinigt wurde (Material und Methoden 7.2 bzw. 8.1).

Synthese und Analyse von (*E*)-Phenylitaconat. (*E*)-Phenylitaconat wurde ausgehend von Benzaldehyd und Dimethylsuccinat nach Ravina et al. (2002) synthetisiert (Material und Methoden 7.1). Aus 7,2 g Benzaldehyd und 12,8 g Dimethylsuccinat wurden 10,6 g weißes Pulver erhalten, das mittels UV/Vis-Spektroskopie und RP-HPLC über eine C18-Säule als reines (*E*)-Phenylitaconat detektiert wurde (Abb. 6, A). Das UV/Vis-Spektrum des Produktes zeigte Absorptionsmaxima bei etwa 210 nm (Carboxygruppe) und 270 nm (Abb. 6, B). Die Ausbeute der Synthese lag bei 78 % und wurde um 5 % gesteigert (C. Feil, 2006).

Synthese und Analyse von (*E*)-Phenylitaconyl-CoA. Die Herstellung von (*E*)-Phenylitaconyl-CoA erfolgte über das Säureanhydrid des (*E*)-Phenylitaconats (Material und Methoden 7.2). Dazu wurden äquimolare Mengen (*E*)-Phenylitaconat und Essigsäureanhydrid in Essigsäure gelöst und auf 120°C erhitzt. Bei dieser Temperatur verdampft die Essigsäure und verschiebt das Reaktionsgleichgewicht in Richtung der Bildung des (*E*)-Phenylitaconat-Anhydrids. Das entstandene (*E*)-Phenylitaconsäureanhydrid ist bei 120°C flüssig und verfestigt sich beim abkühlen auf Raumtemperatur. Es wurde gemörsert und bis zur weiteren Verwendung auf Silikagel bei -20°C gelagert. Die Synthese des CoA-Thioesters erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Schachter und Taggart (1976). Dabei wurden alle Syntheseschritte bis zum Nachweis freier Säuren durch den Nitroprussid-Test (Material und Methoden 8.2) unter anaeroben Bedingungen bei 4°C bzw. auf Eis durchgeführt. Nach Reaktionsende wurde der Ansatz mit HCl angesäuert und die nicht umgesetzte freie Säure mit Dimethylether entfernt. Die wässrige Phase wurde lyophilisiert und mittels RP-HPLC und UV/Vis-Spektroskopie auf Reinheit untersucht (Material und Methoden 8.1).

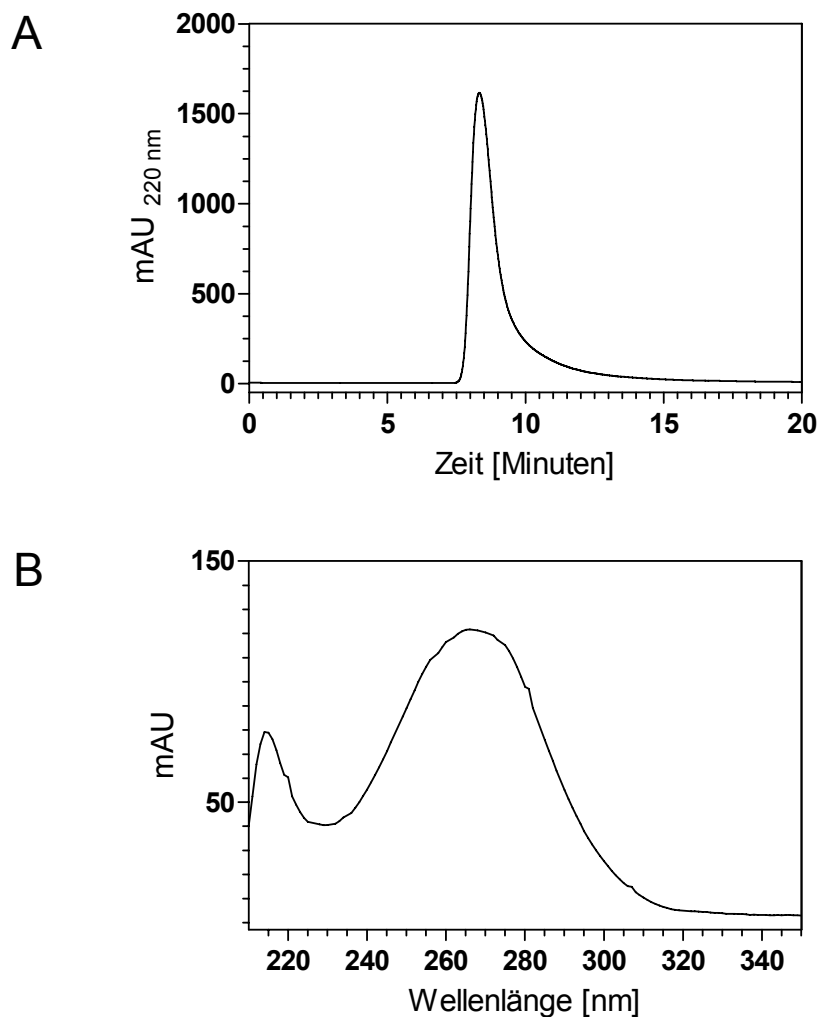


Abb. 6: Produkt-Analyse der Synthese von (*E*)-Phenylitaconat. A: RP-HPLC-Chromatogramm. Das Syntheseprodukt wurde mittels RP-HPLC und UV-Detektion bei 220 nm aufgetrennt. Unter isokratischen Bedingungen (20 % Acetonitril und 32 mM Ameisensäure; pH 3,0) eluierte eine Substanz nach 9 Minuten. **B: UV/Vis-Spektrum.** Das UV/Vis-Spektrum der Substanz wurde während des HPLC-Laufes mit Hilfe eines Diodenarray-Detektors aufgenommen. Das Spektrum zeigt eine für (*E*)-Phenylitaconat charakteristische Absorption bei 210 nm und 270 nm. mAU: milli-absorbance unit.

Neben nicht umgesetztem Coenzym A (CoA) wurden über RP-HPLC anstatt einem Syntheseprodukt zwei Syntheseprodukte mit einer Elutionszeit von 2,5 bzw. 3,5 Minuten detektiert (Abb. 7, A), die in vorangehenden Arbeiten nicht beobachtet wurden (C. Feil, 2006; C. Leutwein, 2000). Die UV/Vis-Spektren beider Substanzen unterschieden sich nicht voneinander: beide zeigten ein Maximum bei 260 nm, die für CoA-Thioester übliche Schulter bei 232 nm und eine für (*E*)-Phenylitaconyl-CoA charakteristische Absorption bei 290 nm (Abb. 7, B). Beide Produkt-haltigen Fraktionen wurden daher lyophilisiert und anschließend die Umsetzung durch gereinigte (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase überprüft (Material und Methoden 6.7.1). Im Gegensatz zum Syntheseprodukt 2 wurde das Syntheseprodukt 1 von dem Enzym nicht umgesetzt (Daten nicht gezeigt). Bei den beiden Produkten handelt es sich

daher möglicherweise um die Regioisomere 1-(*E*)-Phenylitaconyl-CoA und 4-(*E*)-Phenylitaconyl-CoA (Abb. 7, A: Syntheseprodukte 1 bzw. 2), deren Strukturformeln in Abb. 8 dargestellt sind. Die lyophilisierten Isomere wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Bei Lagerung über drei Monate hinaus wurde eine Hydrolyse der Isomere zu freiem CoA und (*E*)-Phenylitaconat beobachtet. Die durchschnittliche Gesamtausbeute der in dieser Arbeit durchgeführten Synthesen lag bei 75 %. Davon lag zu 43 % das Isomer 4-(*E*)-Phenylitaconyl-CoA und zu 32 % das 1-(*E*)-Phenylitaconyl-CoA-Isomer vor. Um Verwechslungen zu vermeiden wird das Regioisomer 4-(*E*)-Phenylitaconyl-CoA im Verlauf der weiteren Arbeit als (*E*)-Phenylitaconyl-CoA bezeichnet.

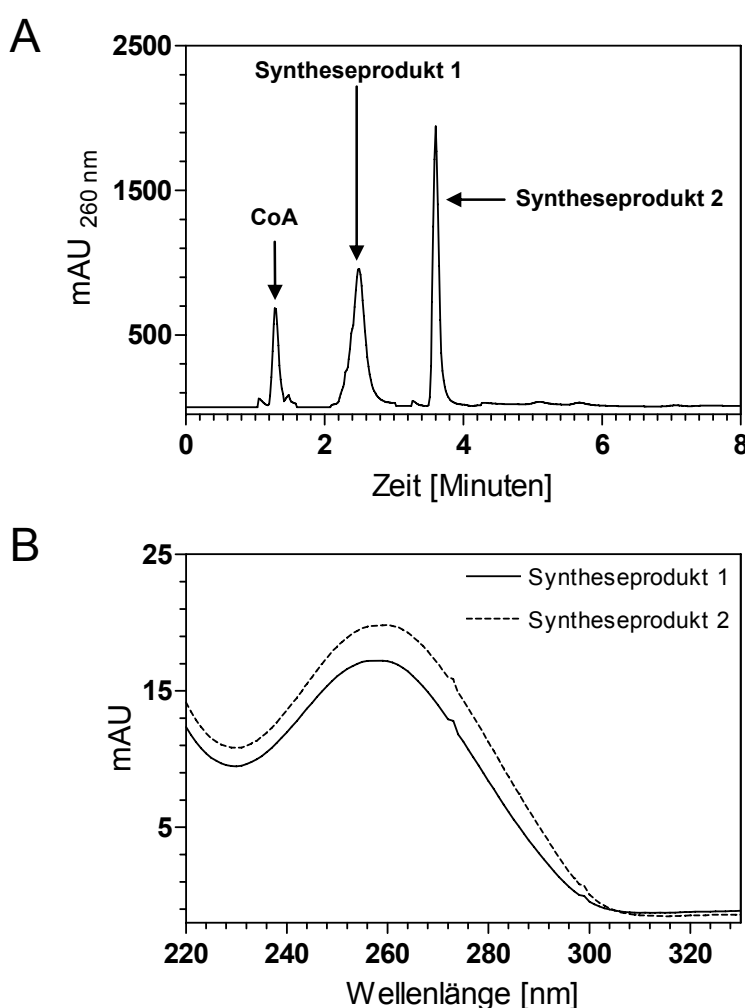


Abb. 7: Produkt-Analyse der Synthese von (*E*)-Phenylitaconyl-CoA. A: RP-HPLC-Chromatogramm. Die Syntheseprodukte wurden mittels RP-HPLC mit UV-Detektion bei 260 nm aufgetrennt. Unter einem linearem Gradient von 3-20 % Acetonitril in 50 mM MOPS/NaOH (pH 6,2) eluierte nicht umgesetztes CoA nach 1,5 Minuten, 1-(*E*)-Phenylitaconyl-CoA (Syntheseprodukt 1) nach 2,5 Minuten und 4-(*E*)-Phenylitaconyl-CoA (Syntheseprodukt 2) nach 3,5 Minuten. **B: UV/Vis-Spektrum.** Die UV/Vis-Spektren beider Regioisomere wurden während des HPLC-Laufes mit Hilfe eines Diodenarray-Detektors aufgenommen. Beide Spektren zeigen die für (*E*)-Phenylitaconyl-CoA charakteristische Absorption bei 290 nm, die für CoA-Thioester typische Schulter bei 232 nm und ein Maximum bei 260 nm. mAU: milli-absorbance unit.

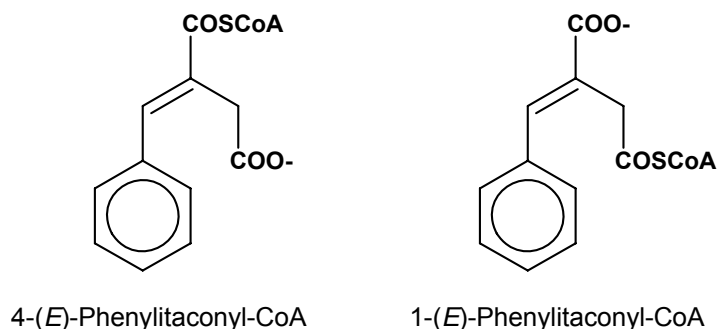


Abb. 8: Regioisomere von (*E*)-Phenylitaconyl-CoA. Im Gegensatz zu 4-(*E*)-Phenylitaconyl-CoA wird 1-(*E*)-Phenylitaconyl-CoA von gereinigter (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase nicht umgesetzt.

1.1.2 Überproduktion und Reinigung der (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase

Die (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase wurde in *E. coli* BL21 (DE3) überproduziert und anschließend unter aeroben Bedingungen über zwei Chromatographieschritte gereinigt (Material und Methoden 6.1 und 6.2.1). Die Enzymaktivität der (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase wurde photometrisch mit (*E*)-Phenylitaconyl-CoA als Substrat bestimmt (Material und Methoden 6.7.1), wobei im Zellextrakt aufgrund der Anwesenheit von Thioesterasen keine verlässlichen Werte erhalten wurden (siehe Tab. 22).

Anionenaustauschchromatographie an DEAE-Sephrose. Zellextrakte mit überproduzierter (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase wurden auf eine DEAE-Sephrose-Säule aufgetragen. Das Enzym eluierte zwischen 75 und 125 mM KCl (Daten nicht gezeigt) und die spezifische Aktivität in dieser Fraktion betrug $8 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$. Die (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase wurde um den Faktor 6 angereichert und die Ausbeute lag bezogen auf die apparente Aktivität im Zellextrakt mit überproduziertem Protein bei 45 % (siehe Tab. 22). Durch RP-HPLC-Analysen wurde nachgewiesen, dass in dieser Proteinfraction keine CoA-Thioesterasen mehr vorhanden waren, die (*E*)-Phenylitaconyl-CoA zu freiem CoA und (*E*)-Phenylitaconat hydrolysieren (Daten nicht gezeigt).

Chromatographie an Hydroxyapatit. Das (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase-haltige Eluat nach Chromatographie an DEAE-Sephrose wurde auf eine keramische Hydroxyapatit-Säule aufgetragen und das Enzym eluierte bei einer Kaliumphosphat-Konzentration von 30 bis 60 mM (Daten nicht gezeigt). Die spezifische Aktivität der (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase lag nach diesem Chromatographieschritt bei $27 \pm 4 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$. Die Ausbeute lag bezogen auf die Aktivität im Zellextrakt bei 25 % und das Enzym wurde um

den Faktor 19 angereichert (siehe Tab. 22).

Aus 6 g Zellen (562 mg lösliches Gesamtprotein) wurden 7 mg gereinigte (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase erhalten. Sie entspricht damit 1,5 % des löslichen Gesamtproteins der überproduzierenden Zellen. In Abbildung 9 ist ein SDS-Polyacrylamidgel gezeigt, auf das die vereinigten Fraktionen mit (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase nach den einzelnen Chromatographieschritten aufgetragen wurden.

Tab. 22: Reinigungstabelle der (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase. Der Anreicherungsfaktor und die Ausbeute beziehen sich auf die apparente Aktivität, die in Zellextrakten mit überproduzierter (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase bestimmt wurde. Die tatsächliche Ausbeute und Anreicherung ist wegen der Thioesterase-Hintergrundaktivität im Zellextrakt vermutlich höher.

Fraktion	Protein [mg]	Aktivität ¹	Spezifische Aktivität ²	Anreicherung [fach]	Ausbeute [%]
Extrakt	562	753	1,4	1	100
DEAE	42	338	8	6	45
Hydroxyapatit	7	189	27	19	25

¹ [$\mu\text{mol min}^{-1}$]

² [$\mu\text{mol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$]

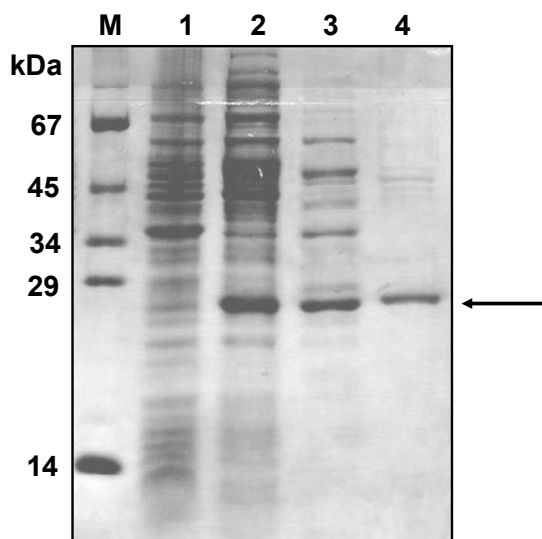


Abb. 9: SDS-Reinigungsgel der (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase. Gezeigt ist die Reinigung der 28 kDa großen (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase über zwei Chromatographieschritte. Der Pfeil markiert die Bande des überproduzierten Enzyms. Ganze Zellen von *E. coli* BL21(DE3) mit pCR-Script-*bbsH* vor und nach Induktion mit 1 mM IPTG, sowie die Proben der Enzym-haltigen Fraktionen nach den beiden Chromatographieschritten wurden über ein 15%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Färbung erfolgte mit Coomassie-Blau. **M:** Molekularmassenstandard. **1:** Ganze Zellen von *E. coli* vor Induktion mit 1 mM IPTG. **2:** Ganze Zellen von *E. coli* nach Induktion mit 1 mM IPTG. **3:** DEAE-Sepharose-Fraktion (75-125 mM KCl). **4:** Hydroxyapatit-Fraktion (30-60 mM Kaliumphosphat).

1.1.3 Photometrischer Test zum Nachweis der Enzymaktivität der (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase

Die Aktivität der (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase wurde in einem photometrischen Enzymtest bestimmt (Material und Methoden 6.7.1). Das eingesetzte Substrat, (*E*)-Phenylitaconyl-CoA, wurde chemisch synthetisiert und auf seine chemische Reinheit analysiert (siehe Ergebnisse 1.1.1). Es weist eine charakteristische Absorptionsschulter bei 290 nm auf, welche durch die C-C-Doppelbindung des (*E*)-Phenylitaconyl-Anteils verursacht wird. Da das hydratisierte Produkt dieser Reaktion aufgrund der Auflösung der Doppelbindung nicht mehr bei 290 nm absorbiert, wurde die Enzymaktivität durch die Abnahme der Absorption bei 290 nm ($A_{290\text{nm}}$) photometrisch bestimmt (Material und Methoden 6.7.1). Der Extinktionskoeffizient von (*E*)-Phenylitaconyl-CoA bei 290 nm wurde experimentell zu $5800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ bestimmt, indem die Absorption bekannter Mengen gemessen wurde. Dieser Wert stimmt gut dem von C. Feil (2006) bestimmten Extinktionskoeffizienten von $5600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ überein.

Für den Enzymtest erwies es sich als Problem, dass (*E*)-Phenylitaconyl-CoA bei neutralen pH-Werten ($> \text{pH } 7,0$) sehr schnell wieder zu freiem CoA und (*E*)-Phenylitaconat hydrolysierte (C. Feil, 2006). Dies führt zu einer schnellen Abnahme der $A_{290\text{nm}}$, die keine Bestimmung der Enzymaktivität zulässt. Deshalb wurde die Umsetzung mit Puffern von pH 5,8 bis pH 7,5 (im Bereich von pH 5,8 bis pH 6,5 mit 50 mM MES/NaOH, von pH 6,6 bis pH 7,5 mit 50 mM MOPS/NaOH) getestet. Dabei wurden jeweils Parallelansätze mit und ohne Enzym angesetzt und die Enzym-Aktivität mit den jeweiligen Absorptionsdifferenzen korrigiert. Als pH-Optimum der von der (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase katalysierten Reaktion wurde ein pH-Bereich von pH 6,2 bis pH 6,3 ermittelt (Abb. 10). Die spezifische Aktivität betrug dabei durchschnittlich $26 \pm 3 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$.

Die Aktivität der (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase wurde durch den Zusatz von 5 mM EDTA zum Puffer nicht beeinträchtigt (Daten nicht gezeigt). Dies zeigt, dass deren Aktivität unabhängig von zweiwertigen Metallen ist.

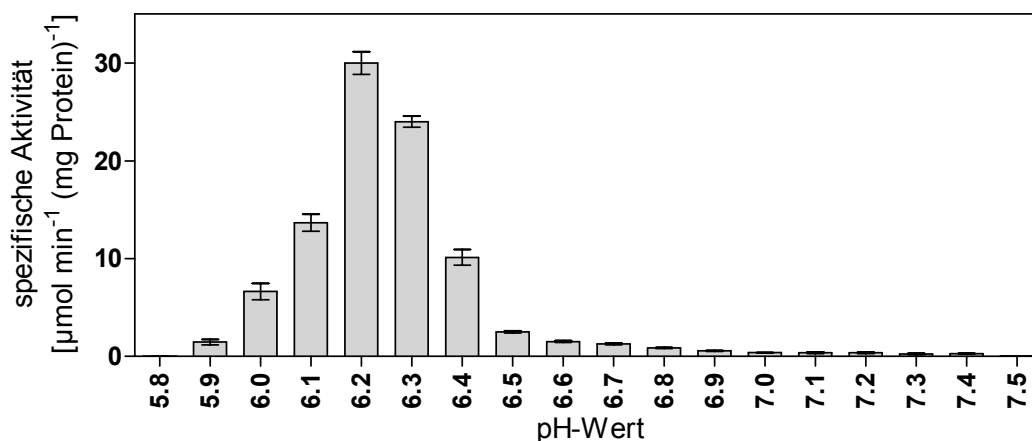


Abb. 10: Enzymaktivität der (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase bei unterschiedlichen pH-Werten. Enzymreaktionen wurden in 50 mM MES/NaOH im Bereich von pH 5,8 bis pH 6,5 und 50 mM MOPS/NaOH im Bereich von pH 6,5 bis pH 7,5 bei RT durchgeführt. Dabei wurden Parallelansätze mit und ohne Enzym angesetzt und die Enzym-Aktivität mit den jeweiligen Absorptionsdifferenzen korrigiert. Das Optimum der von der (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase katalysierten Reaktion liegt zwischen pH 6,2 und pH 6,3. Dargestellt sind Mittelwerte dreier voneinander unabhängiger Messungen.

1.1.4 Produktnachweis über RP-HPLC

Die Bildung eines Produktes in der von gereinigter (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase katalysierten Reaktion wurde über RP-HPLC-Analyse untersucht (Material und Methoden 6.7.5). Dabei wurde nach 15 Minuten Reaktionszeit bei gleichzeitiger Abnahme des Substrates (*E*)-Phenylitaconyl-CoA ein Produkt detektiert, das nach 3 Minuten eluierte und abhängig von der Anwesenheit gereinigter (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase war (Abb. 11). In Kontrollansätzen, die das Enzym ohne Substrat bzw. das Substrat ohne Enzym enthielten, wurde dieses Produkt nicht gebildet (Daten nicht gezeigt). Die erhaltenen Daten und die UV/Vis-Spektren des Produktes (Abb. 12) stimmen gut mit vorläufigen Untersuchungen überein, bei denen die Bildung des Produktes ebenfalls über RP-HPLC beobachtet wurde (C. Feil, 2006).

Das Reaktionsprodukt wurde bereits von C. Feil (2006) über HPLC-MS-Analysen als 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA identifiziert. Dies konnte in dieser Arbeit nochmals bestätigt werden und das erhaltene Massenspektrum ist daher im Anhang gezeigt (siehe Anhang, 1.).

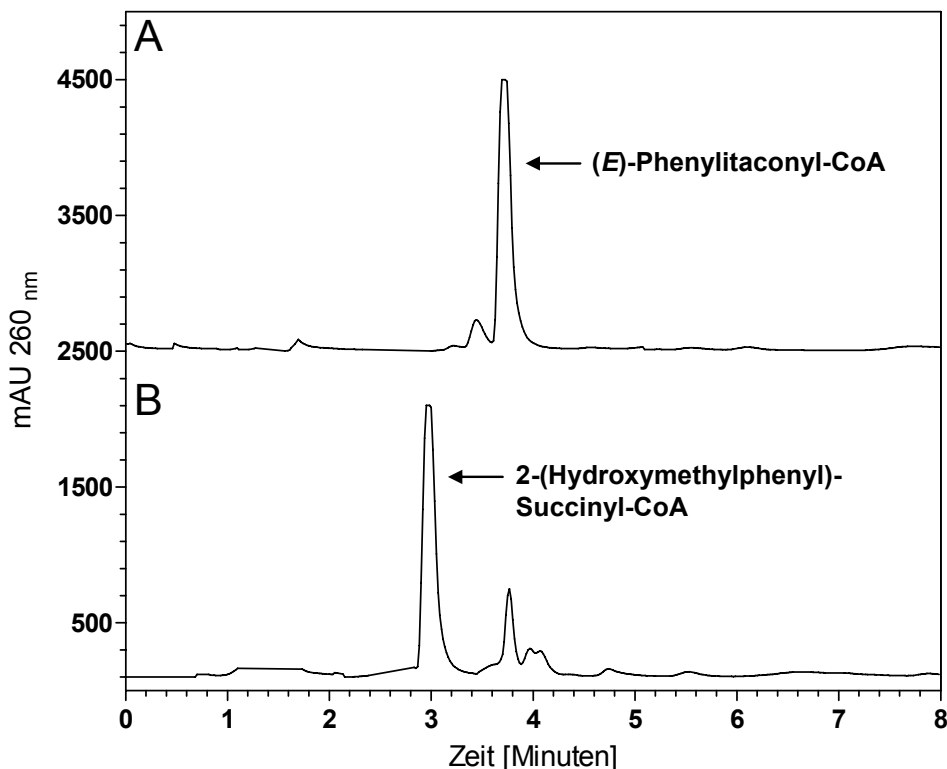


Abb. 11: Produkt-Analyse der Umsetzung von *(E)*-Phenylitaconyl-CoA durch gereinigte *(E)*-Phenylitaconyl-CoA Hydratase. Die Reaktionen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten mit Säure gestoppt und nach Entfernen der Proteinfraction wurde der Überstand mittels RP-HPLC über einen linearen Gradienten von 3-20 % Acetonitril in 50 mM MES/NaOH (pH 6,2) mit UV-Detektion bei 260 nm analysiert. **A: Reaktion nach 0 Minuten.** Das Substrat *(E)*-Phenylitaconyl-CoA eluierte nach etwa 4 Minuten. **B: Reaktion nach 15 Minuten.** Das Produkt der *(E)*-Phenylitaconyl-CoA Hydratase-Reaktion, 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA, eluierte nach 3 Minuten. mAU: milli-absorbance unit.

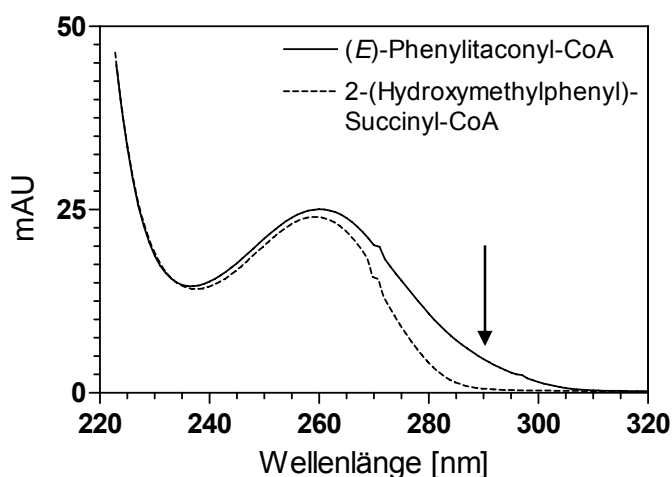


Abb. 12: UV/Vis-Spektrum des in der RP-HPLC-Analyse detektierten Produktes 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA. Das UV/Vis-Spektrum des Produktes wurde während des Laufes mit Hilfe eines Dioden-Array-Detektors aufgenommen. Durch Hydratisierung der Doppelbindung absorbiert das Produkt 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA bei einer Wellenlänge von 290 nm nicht mehr (Pfeil). Zum Vergleich ist das Spektrum von *(E)*-Phenylitaconyl-CoA dargestellt. mAU: milli-absorbance unit.

1.1.5 Biochemische Charakterisierung der (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase

Bestimmung der apparenten Molekülmasse. Die native Molekülmasse gereinigter (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase wurde durch zwei Methoden bestimmt, nämlich Chromatographie an einer Gelfiltrationssäule und Ferguson-Analyse nativer Polyacrylamidgele (Material und Methoden, 6.9).

Die Gelfiltrationssäule wurde durch Chromatographie von Proteinen bekannter Masse geeicht und die Ermittlung der jeweiligen K_{AV} -Werte zur Bestimmung der apparenten Molekülmasse wurde wie in Material und Methoden 6.9.1 beschrieben durchgeführt. Die (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase eluierte bei einem Volumen von etwa 180 ml, was anhand der Eichgerade einer Molekülmasse von $110 \text{ kDa} \pm 7 \text{ kDa}$ entspricht (Abb. 13).

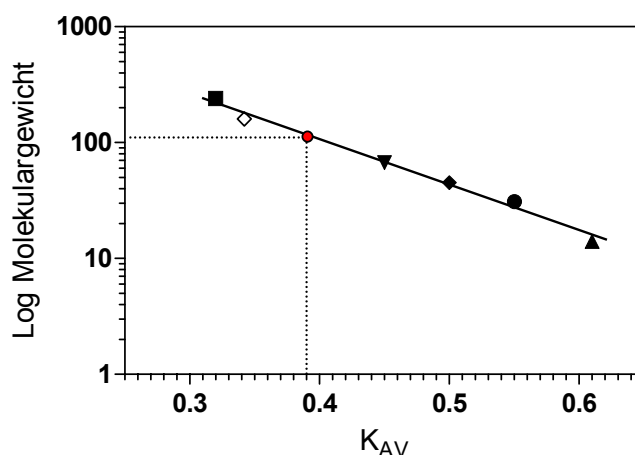


Abb. 13: Eichgerade zur Bestimmung der apparenten Molekülmasse gereinigter (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase. Die Bestimmung der Molekülmasse erfolgte über die Berechnung des K_{AV} -Wertes, der anschließend gegen den Logarithmus des Molekulargewichtes (kDa) der Standardproteine aufgetragen wurde. Die Eichgerade wurde anhand folgender Standardproteine erstellt: ■: Katalase (240 kDa), ◇: Aldolase (160 kDa), ▼: Rinderserumalbumin (67 kDa), ◆: Ovalbumin (45 kDa), •: Lactat-Dehydrogenase (34 kDa), ▲: Lysozym (14 kDa), •: (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase ($110 \text{ kDa} \pm 7 \text{ kDa}$).

Über Ferguson-Analyse nativer Polyacrylamidgele wurde eine unabhängige Bestätigung der Molekülmasse der (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase durchgeführt (Material und Methoden 6.9.2). Dazu wurde das gereinigte Protein durch Nativgelelektrophorese in Polyacrylamidgelen mit verschiedenen Konzentrationen an Acrylamid (6% bis 10 %) aufgetrennt (Daten nicht gezeigt). Als Massenstandards dienten Ovalbumin und Monomer- und Oligomer-Formen von Rinderserumalbumin, die in denselben Gelen aufgetrennt wurden.

Die Logarithmen der ermittelten relativen Laufstrecken (R_f) wurden gegen die jeweilige Gelkonzentration aufgetragen und daraus Ausgleichsgeraden berechnet (Abb. 14, A). Anschließend wurde eine Eichgerade aus den Logarithmen der Beträge der Steigungen der einzelnen Geraden (k) und den Logarithmen der Molekülmassen der Standardproteine erstellt (Abb. 14, B). Daraus wurde die apparente Molekülmasse der (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase zu $123 \text{ kDa} \pm 6 \text{ kDa}$ bestimmt (Abb. 14, B).

Beide ermittelten Molekülmassen stimmen gut mit der theoretisch berechneten Molekülmasse des Enzyms von 112 kDa überein und bestätigen die Ergebnisse von C. Feil (2006). Da eine Untereinheit der (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase eine Masse von 28 kDa hat, liegt das Enzym also als Tetramer (α_4 -Komposition) vor.

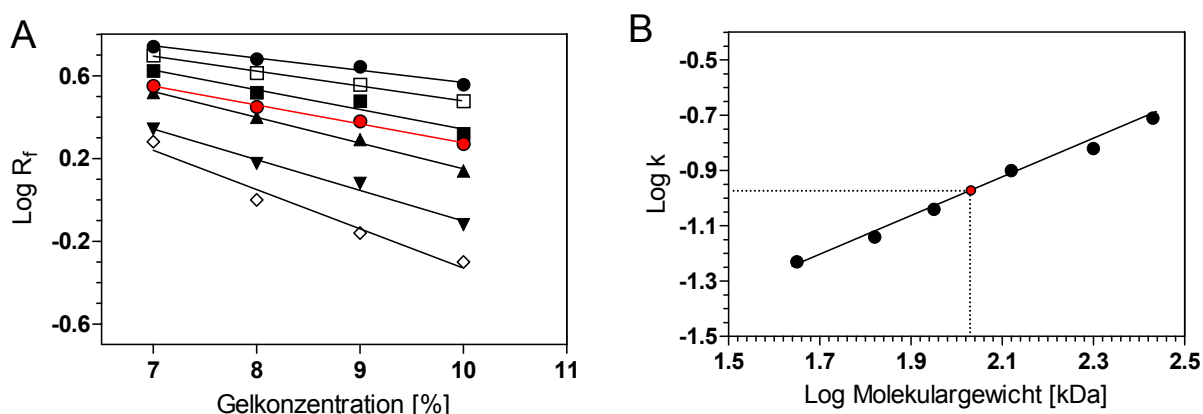


Abb. 14: Ferguson-Analyse zur Bestimmung der apparenten Molekülmasse gereinigter (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase. A: Auftrag der Logarithmen der relativen Laufstrecken (R_f) der Standardproteine sowie der (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase gegen die entsprechenden Polyacrylamidkonzentrationen der nativen Gele und deren Ausgleichsgeraden. ● Ovalbumin Monomer (45 kDa), □ BSA Monomer (67 kDa); ■ Ovalbumin Dimer (90 kDa), ▲ BSA Dimer (134 kDa); ▼ BSA Trimer (201 kDa); ◇ BSA Tetramer (268 kDa), ● (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase. **B:** Eichgerade aus den Logarithmen der Beträge der Steigungen der Ausgleichsgeraden (k) und den Logarithmen der Molekülmassen der Standardproteine. Daraus wurde die Molekülmasse der (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase zu $123 \text{ kDa} \pm 6 \text{ kDa}$ (●) bestimmt.

Kinetik der (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase. Kinetische Daten wurden im photometrischen Enzymtest mit (*E*)-Phenylitaconyl-CoA als Substrat (Material und Methoden 6.8.1) ermittelt. Dabei wurden verschiedene Konzentrationen des Substrates eingesetzt ($50\text{--}500 \text{ } \mu\text{M}$) und die Abnahme der $A_{290\text{nm}}$ verfolgt. Die erhaltenen Datenreihen wurden mit dem Graphikprogramm Prism4.00 (GraphPad Software; La Jolla, CA, USA) graphisch dargestellt und durch nicht-lineare Regression analysiert. Die Datenpunkte deuteten eher auf einen sigmoidalen als auf einen hyperbolischen Kurvenverlauf hin und des Weiteren wurden

absinkende Aktivitäten bei steigender Substratkonzentration beobachtet. Daher wurde nicht die Hill-Gleichung (Gleichung 2) sondern eine modifizierte Hill-Gleichung (Gleichung 3) für die Kurvenanpassung zugrunde gelegt (Abb. 15).

$$v = \frac{V_{\max} \cdot [x]^N}{K_m + [x]^N}$$

Gleichung 2: Hill-Gleichung. V_{\max} : maximale Geschwindigkeit, K_m : Michaelis-Konstante, x : Substratkonzentration, N : durchschnittliche Zahl der Substrate im aktiven Zentrum (Hill-Koeffizient).

$$v = \frac{V_{\max} \cdot [x]^N}{K_m + [x]^N + \frac{[x]^{N+M}}{K_{is}^M}}$$

Gleichung 3: Modifizierte Inhibitions-Gleichung für nicht-kompetitive Hemmung von kooperativen Enzymen (Höffken et al., 2006). V_{\max} : maximale Geschwindigkeit, K_m : Michaelis-Konstante, x : Substratkonzentration, K_{is} : Substratinhibitions-Konstante, N : durchschnittliche Zahl der Substrate im aktiven Zentrum (Hill-Koeffizient), M : durchschnittliche Zahl der zusätzlichen Substrate an der allosterischen Stelle des Enzyms.

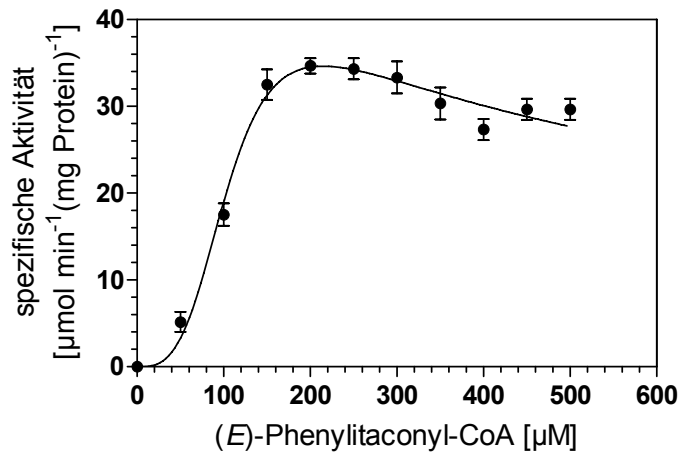


Abb. 15: Reaktionskinetik der (E)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase mit (E)-Phenylitaconyl-CoA als Substrat. Zur Bestimmung von Enzymkinetischen Parametern wurde die Aktivität der (E)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase bei Substratkonzentrationen von 50 μM bis 500 μM durch Abnahme der $A_{290\text{nm}}$ gemessen. Die erhaltenen Datenpunkte wurden gegen die um einen Substratinhibitionstern erweiterte Hill-Gleichung gefittet. Für die (E)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase wurde damit ein Hill-Koeffizient von $N=4$, ein apparenter K_m -Wert von $109 \pm 7 \mu\text{M}$, ein V_{\max} von $32 \pm 3 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$, ein K_{is} von $234 \pm 12 \mu\text{mol}$ und ein M von 0,83 ermittelt (R^2 : 0,976). Dargestellt sind Mittelwerte von vier voneinander unabhängigen Messungen.

1.2 (*E*)-Phenylitaconyl-*N*-Acetylcysteamin als alternatives Substrat der (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase

Aus vielen vorhergehenden Arbeiten ist bekannt, dass der Coenzym A-Anteil im Substrat einer β -Oxidation oft durch *N*-Acetylcysteamin ersetzt werden kann (Decker, 1959). *N*-Acetylcysteamin-Derivate können also die Anwesenheit des physiologischen Substrates simulieren, sind aber wesentlich einfacher herzustellen und billiger. In dieser Arbeit wurde deshalb die Umsetzung von (*E*)-Phenylitaconyl-*N*-Acetylcysteamin als alternatives Substrat durch die (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase überprüft.

1.2.1 Chemische Synthese von (*E*)-Phenylitaconyl-*N*-Acetylcysteamin

Die Synthese von (*E*)-Phenylitaconyl-*N*-Acetylcysteamin erfolgte analog zur Synthese von (*E*)-Phenylitaconyl-CoA über das Säureanhydrid des (*E*)-Phenylitaconats und anschließende Umsetzung zum *N*-Acetylcysteamin-Derivat (Material und Methoden 7.3). Das synthetisierte (*E*)-Phenylitaconyl-*N*-Acetylcysteamin wurde mittels RP-HPLC über eine C18-Säule analysiert (Material und Methoden 8.1). Im Gegensatz zur Synthese von (*E*)-Phenylitaconyl-CoA wurde dabei nur ein Produkt detektiert, das nach etwa 4,5 Minuten eluierte (Abb. 16, A). Nicht umgesetztes *N*-Acetylcysteamin eluierte nach etwa 3,5 Minuten (Abb. 16, A). Das UV/Vis-Spektrum des Syntheseproduktes zeigt ein Maximum bei 260 nm und die charakteristische Absorptionsschulter bei 290 nm, welche durch die C-C-Doppelbindung des (*E*)-Phenylitaconyl-Anteils verursacht wird (Abb. 16, B).

1.2.2 Stabilität von (*E*)-Phenylitaconyl-*N*-Acetylcysteamin bei verschiedenen pH-Werten

Wie bei (*E*)-Phenylitaconyl-CoA bereits beobachtet war auch (*E*)-Phenylitaconyl-*N*-Acetylcysteamin bei pH-Werten von > pH 7,0 sehr hydrolyseempfindlich. Definierte Mengen des Derivates wurden in Puffer mit pH-Werten von pH 5,9 bis pH 7,5 (im Bereich von pH 5,8 bis pH 6,5 mit 50 mM MES/NaOH, von pH 6,6 bis pH 7,5 mit 50 mM MOPS/NaOH) gelöst, für ein bis zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend über RP-HPLC analysiert (Material und Methoden 8.1). Alle Ansätze über einem pH-Wert von > 6,9 waren

dabei völlig zu freiem *N*-Acetylcysteamin und (*E*)-Phenylitaconat hydrolysiert (Daten nicht gezeigt).

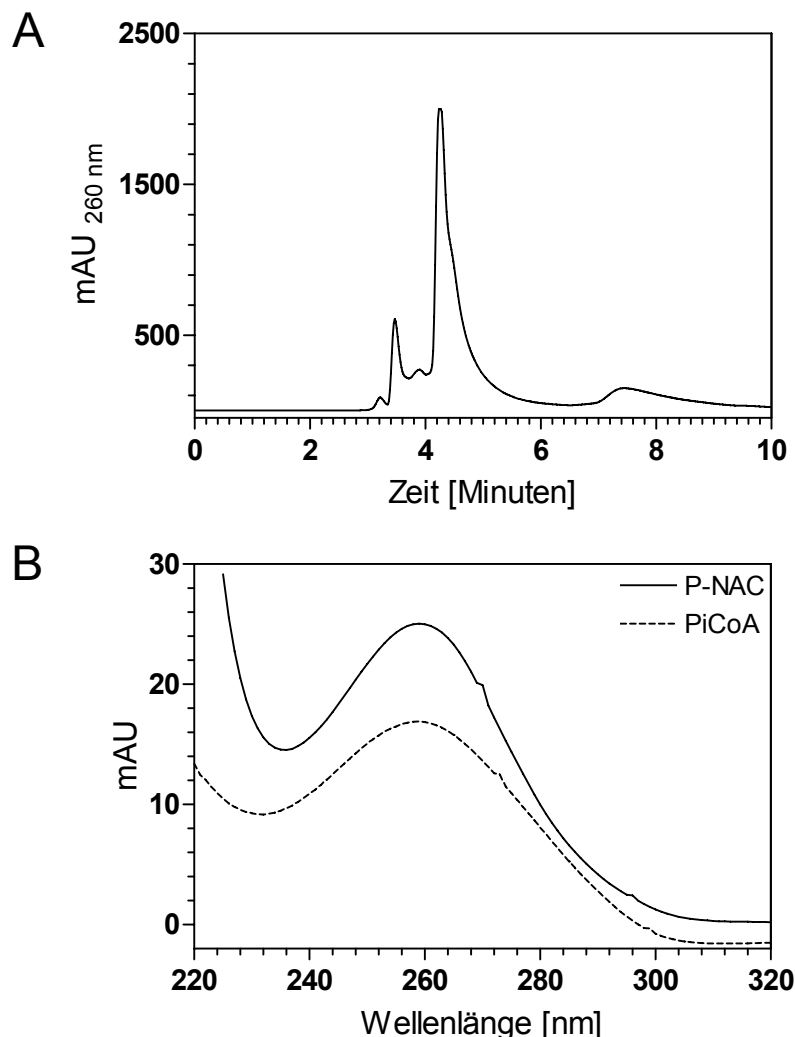


Abb. 16: Produkt-Analyse der Synthese von (*E*)-Phenylitaconyl-*N*-Acetylcysteamin. A: RP-HPLC-Chromatogramm. Das Syntheseprodukt wurde mittels RP-HPLC mit UV-Detektion bei 260 nm aufgetrennt. Unter einem linearem Gradient von 3-20 % Acetonitril in 50 mM MOPS/NaOH (pH 6,2) eluierte nicht umgesetztes *N*-Acetylcysteamin nach ca. 3,5 Minuten, (*E*)-Phenylitaconyl-*N*-Acetylcysteamin nach etwa 4,5 Minuten. **B: UV/Vis-Spektrum.** Das UV/Vis-Spektrum des Syntheseproduktes wurde während des HPLC-Laufes mit Hilfe eines Diodenarray-Detektors aufgenommen. Das Spektrum zeigt ein Absorptionsmaximum bei 260 nm eine Absorption bei 290 nm. Zum Vergleich ist das Spektrum von (*E*)-Phenylitaconyl-CoA dargestellt. P-NAC: (*E*)-Phenylitaconyl-*N*-Acetylcysteamin; PiCoA: (*E*)-Phenylitaconyl-CoA, mAU: milli-absorbance unit.

1.2.3 Aktivität der (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase mit (*E*)-Phenylitaconyl-*N*-Acetylcysteamin als Substrat

Die Umsetzung von (*E*)-Phenylitaconyl-*N*-Acetylcysteamin durch die (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase wurde photometrisch durch die Abnahme der $A_{290\text{nm}}$ bestimmt (Material und Methoden 6.7.1). Der Extinktionskoeffizient von (*E*)-Phenylitaconyl-*N*-Acetylcysteamin bei 290 nm wurde experimentell zu $7230 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ermittelt, indem die Absorption bekannter Mengen gemessen wurde (Daten nicht gezeigt).

Analog zu den Untersuchungen mit (*E*)-Phenylitaconyl-CoA als Substrat wurde die Umsetzung von (*E*)-Phenylitaconyl-*N*-Acetylcysteamin mit Puffern von pH 5,8 bis pH 7,5 durchgeführt (siehe Ergebnisse 1.1.3). Dabei wurde kein Unterschied im Vergleich zur Umsetzung von (*E*)-Phenylitaconyl-CoA beobachtet, das pH-Optimum der von der (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase katalysierten Umsetzung von (*E*)-Phenylitaconyl-*N*-Acetylcysteamin liegt zwischen pH 6,2 und pH 6,3 (Abb. 17). Die spezifische Aktivität betrug dabei durchschnittlich $26 \pm 2 \text{ } \mu\text{mol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$.

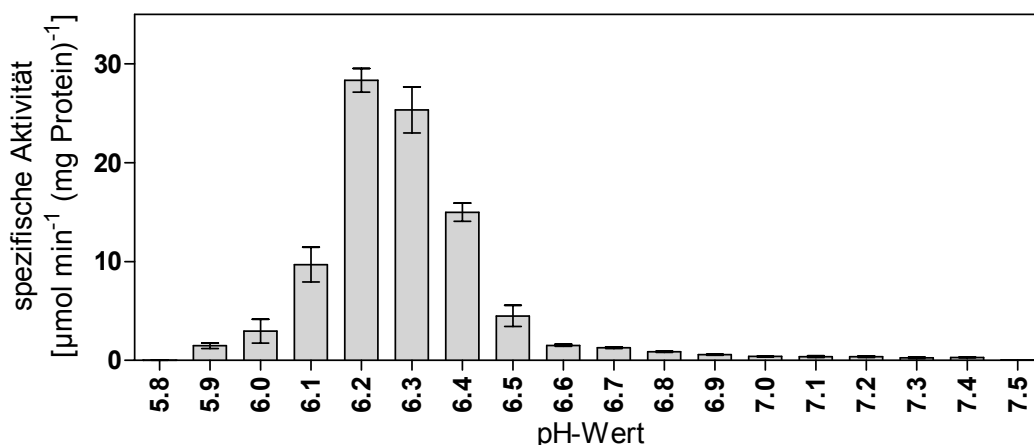


Abb. 17: Enzymaktivität der (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase mit (*E*)-Phenylitaconyl-*N*-Acetylcysteamin als Substrat bei unterschiedlichen pH-Werten. Enzymreaktionen wurden in 50 mM MES/NaOH im Bereich von pH 5,8 bis pH 6,5 und 50 mM MOPS/NaOH im Bereich von pH 6,5 bis pH 7,5 bei RT durchgeführt. Dabei wurden Parallelansätze mit und ohne Enzym angesetzt und die Enzym-Aktivität mit den jeweiligen Absorptionsdifferenzen korrigiert. Das Optimum der von der (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase katalysierten Reaktion liegt zwischen pH 6,2 und pH 6,3. Dargestellt sind Mittelwerte dreier voneinander unabhängiger Messungen.

Zur Ermittlung Enzymkinetischer Parameter wurden verschiedene Konzentrationen des Substrates (*E*)-Phenylitaconyl-*N*-Acetylcysteamin (50-500 μM) eingesetzt und die Abnahme der $A_{290\text{nm}}$ verfolgt (Material und Methoden 6.8.1). Da die erhaltenen Datenpunkte auch mit

diesem Substrat auf Kooperativität des Enzyms und Substrathemmung hinwiesen, wurde für die Kurvenanpassung die Hill-Gleichung mit erweitertem Inhibitionstherm (siehe Gleichung 3, Seite 61) verwendet (Abb. 18). Die ermittelten Parameter sind mit denen aus der Umsetzung von (*E*)-Phenylitaconyl-CoA vergleichbar (siehe Ergebnisse 1.1.5). Daher kann in Zukunft das kostengünstiger herzustellende (*E*)-Phenylitaconyl-*N*-Acetylcysteamin für Versuche eingesetzt werden.

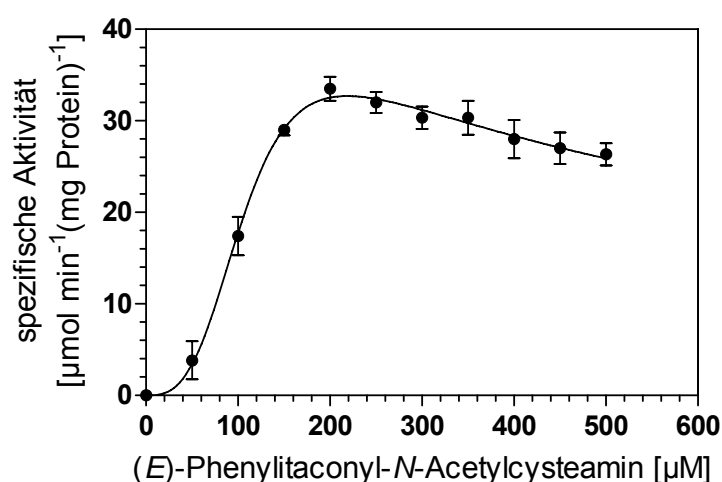


Abb. 18: Reaktionskinetik der (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase mit (*E*)-Phenylitaconyl-*N*-Acetylcysteamin als Substrat. Zur Bestimmung von Enzymkinetischen Parametern wurde die Aktivität der (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase bei Substratkonzentrationen von 50 μM bis 500 μM durch Abnahme der $A_{290\text{nm}}$ gemessen. Die erhaltenen Datenpunkte wurden gegen die um einen Substratinhibitionstherm erweiterte Hill-Gleichung gefittet. Für die Umsetzung von (*E*)-Phenylitaconyl-*N*-Acetylcysteamin durch die (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase wurde damit ein Hill-Koeffizient von $N=4$, ein apparenter K_m -Wert von $101 \pm 3 \mu\text{M}$, ein V_{max} von $31 \pm 1,4 \mu\text{mol min}^{-1}(\text{mg Protein})^{-1}$, ein K_{is} von $226 \pm 9 \mu\text{M}$ und ein M von 0,76 ermittelt (R^2 : 0,983). Dargestellt sind Mittelwerte von fünf voneinander unabhängigen Messungen.

1.3 Reinigung und Charakterisierung der 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA Dehydrogenase

Im *bbs*-Operon von *T. aromatica* wurden die Gene *bbsC* und *bbsD* gefunden, deren Produkte hohe Sequenzhomologien zu kurzkettigen Alkohol-Dehydrogenasen aufweisen und deshalb wahrscheinlich für die Oxidation von 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA zu Benzoylsuccinyl-CoA verantwortlich sind (Leuthner und Heider, 1999). Beide Gene wurden bereits unter Kontrolle eines IPTG-induzierbaren T7-Promotors eines Überproduktionsvektors kloniert und das rekombinante Enzym über Chromatographie an DEAE-Sephrose gereinigt (C. Feil, 2006; B. Leuthner, 1999). Dabei wurde neben der erwarteten Aktivität als Dehydrogenase auch eine zusätzliche unspezifische Hydratase-Aktivität in der Präparation gemessen (C. Feil, 2006). Um zu überprüfen, ob es sich dabei um eine Kontamination aus *E. coli* handelt, wurde in dieser Arbeit die 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA Dehydrogenase weiter gereinigt und biochemisch charakterisiert.

1.3.1 Überproduktion und Reinigung der 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA Dehydrogenase

Die 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA Dehydrogenase wurde wie in Material und Methoden 6.1 beschrieben in *E. coli* überproduziert und das Enzym anschließend unter aeroben Bedingungen über zwei Chromatographieschritte gereinigt (Material und Methoden 6.2.2). Die Aktivität der 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA-Dehydrogenase wurde photometrisch in einem gekoppelten Enzymtest mit (*E*)-Phenylitaconyl-CoA als Substrat bestimmt (Material und Methoden 6.7.2), wobei aufgrund der Anwesenheit von CoA-Thioesterasen im Zellextrakt bzw. einer Hydratase nach Chromatographie an DEAE-Sephrose keine verlässlichen Werte erhalten wurden (siehe Tab. 23).

Anionenaustauschchromatographie an DEAE-Sephrose. Zellextrakte mit überproduzierter 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA Dehydrogenase wurden auf eine DEAE-Sephrose-Säule aufgetragen. Das Enzym eluierte bei einer KCl-Konzentration von 50 bis 100 mM (Daten nicht gezeigt) und die spezifische Aktivität in dieser Fraktion betrug $0,32 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$. Die Ausbeute lag bezogen auf die apparente Aktivität im Zellextrakt mit überproduziertem Protein bei 22 % und das Enzym wurde um den Faktor 1,2 angereichert (siehe Tab. 23). Durch RP-HPLC wurde gezeigt, dass die Enzym-haltige

Fraktion nach diesem Chromatographieschritt keine CoA-Thioesterasen mehr enthielt, die das Substrat (*E*)-Phenylitaconyl-CoA im gekoppelten Enzymtest hydrolysieren (Daten nicht gezeigt).

Chromatographie an Hydroxyapatit. Fraktionen mit 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA-Dehydrogenase nach Chromatographie an DEAE-Sepharose wurden durch Chromatographie an einer keramischen Hydroxyapatit-Säule weiter aufgereinigt. Dabei eluierte das Enzym bei einer Kaliumphosphat-Konzentration von 30 bis 40 mM. Die spezifische Aktivität der 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA Dehydrogenase lag nach diesem Chromatographieschritt bei $0,86 \pm 0,1 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$. Das Enzym wurde um den Faktor 3,1 angereichert und die Ausbeute betrug bezogen auf die Aktivität im Zellextrakt mit überproduziertem Protein 5,5 % (siehe Tab. 23).

Aus 8,9 g Zellen (763 mg lösliches Gesamtprotein) wurden 14 mg gereinigtes Enzym erhalten. Damit machte die 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA Dehydrogenase mindestens 2 % des löslichen Gesamtproteins in den überproduzierenden Zellen aus. In Abbildung 19 ist ein SDS-Polyacrylamidgel gezeigt, auf das die vereinigten Fraktionen mit 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA Dehydrogenase nach den einzelnen Chromatographieschritten aufgetragen wurden.

Tab. 23: Reinigungstabelle rekombinanter 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA Dehydrogenase. Der Anreicherungsfaktor und die Ausbeute beziehen sich auf die apparente Aktivität, die in Zellextrakten mit überproduziertem Enzym bestimmt wurde. Die tatsächliche Ausbeute und Anreicherung ist wegen der Thioesterase-Hintergrundaktivität im Zellextrakt vermutlich höher. Durch Chromatographie an Hydroxyapatit wurde eine Hydratase aus *E. coli* abgetrennt und die spezifische Aktivität der 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA Dehydrogenase konnte ohne Einfluss dieser bestimmt werden (siehe Ergebnisse 1.3.2).

Fraktion	Protein [mg]	Aktivität ¹	Spezifische Aktivität ²	Anreicherung [fach]	Ausbeute [%]
Extrakt	763	220	0,28	1	100
DEAE	150	48	0,32	1,2	22
Hydroxyapatit	14	12	0,86	3,1	5,5

¹ [$\mu\text{mol min}^{-1}$]

² [$\mu\text{mol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$]

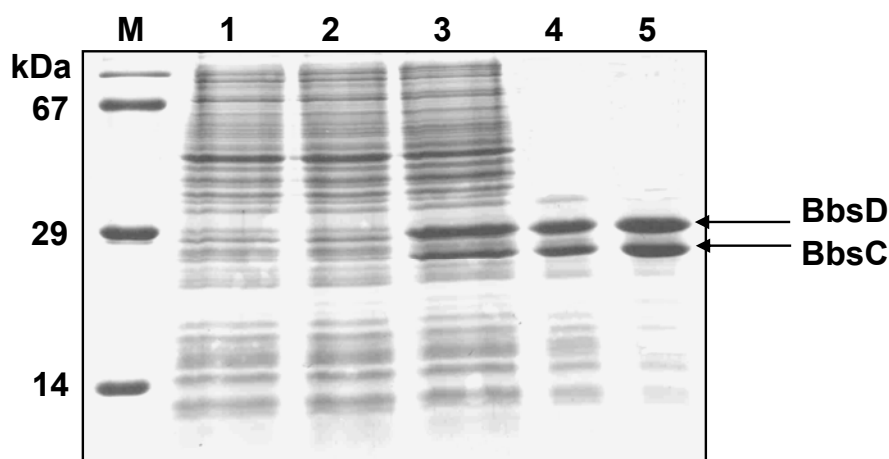


Abb. 19: SDS-Reinigungsgel der 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA Dehydrogenase. Gezeigt ist die Reinigung der beiden Untereinheiten der 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA Dehydrogenase (BbsC: 26 kDa, BbsD: 28 kDa) über zwei Chromatographieschritte. Die Pfeile markieren die Banden des überproduzierten Enzyms. Ganze Zellen von *E. coli* BL21(DE3) mit pCR-Script-*bbsCD* vor und nach Induktion mit 1mM IPTG, sowie die Enzym-haltigen Proben nach den beiden Chromatographieschritten wurden über ein 15%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Färbung erfolgte mit Coomassie-Blau. **M:** Molekularmassenstandard. **1+2:** Ganze Zellen von *E. coli* vor Induktion mit 1 mM IPTG. **3:** Ganze Zellen von *E. coli* 3 Stunden nach Induktion mit 1 mM IPTG. **4:** DEAE-Sepharose-Fraktion (50-100 mM KCl). **5:** Hydroxyapatit-Fraktion (30-40 mM Kaliumphosphat).

1.3.2 Photometrischer Test zum Nachweis der Enzymaktivität der 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA Dehydrogenase

Das Substrat der 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA Dehydrogenase, 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA, ist weder durch einfache chemische Synthese zugänglich noch ist es kommerziell erhältlich. Deshalb wurde die Aktivität des Enzyms in einem gekoppelten Enzymtest mit gereinigter (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase und (*E*)-Phenylitaconyl-CoA als Substrat bestimmt (C. Feil, 2006). Die Oxidation des Reaktionsproduktes der (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase-Reaktion, 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA, zu Benzoylsuccinyl-CoA wurde daher über die Zunahme der $A_{365\text{nm}}$ durch die Reduktion von NAD verfolgt (Material und Methoden 6.7.2).

Aufgrund der Instabilität von (*E*)-Phenylitaconyl-CoA bei neutralen pH-Werten ($> \text{pH } 7,0$) war anzunehmen, dass das Produkt der von der (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase katalysierten Reaktion ebenfalls sehr hydrolyseempfindlich ist (siehe Ergebnisse 1.1.3). Daher wurde die Umsetzung im gekoppelten Enzymtest in leicht sauren Puffern (im Bereich von

pH 5,8 bis pH 6,5 mit 50 mM MES/NaOH) und von pH 6,6 bis pH 7,0 mit 50 mM MOPS/NaOH durchgeführt. Als pH-Optimum der 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA Dehydrogenase wurde ein pH-Wert von pH 6,1 bis pH 6,2 ermittelt (Abb. 20). Die spezifische Aktivität betrug dabei durchschnittlich $0,84 \pm 0,06 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$.

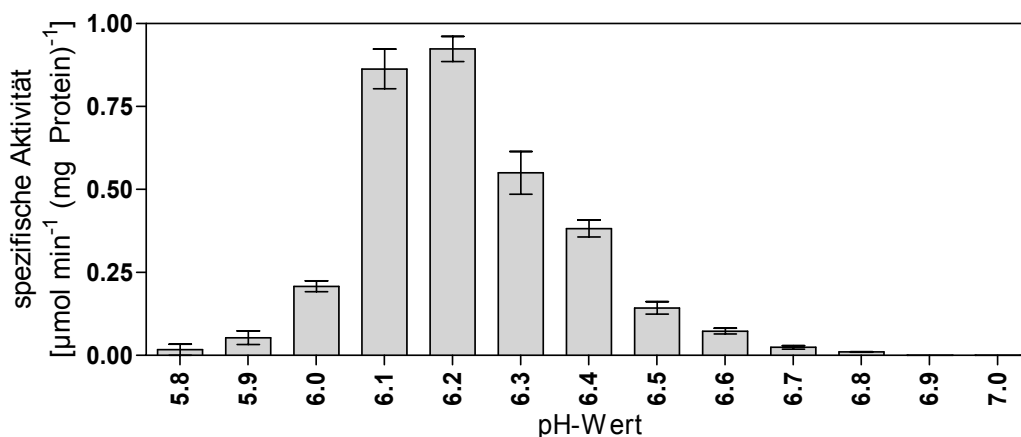


Abb. 20: Enzymaktivität der 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA Dehydrogenase bei unterschiedlichen pH-Werten. Enzymreaktionen wurden im gekoppelten Enzymtest in 50 mM MES/NaOH im Bereich von pH 5,8 bis pH 6,5 und 50 mM MOPS/NaOH im Bereich von pH 6,6 bis pH 7,0 bei RT durchgeführt. Dabei wurden Parallelansätze mit und ohne Enzym angesetzt und die Enzym-Aktivität mit den jeweiligen Absorptionsdifferenzen korrigiert. Das pH-Optimum der von der 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA Dehydrogenase katalysierten Reaktion liegt zwischen pH 6,1 und pH 6,2. Dargestellt sind Mittelwerte dreier voneinander unabhängiger Messungen.

Folgende Enzymtests wurden daher bei pH 6,2 mit 50 mM MES/NaOH durchgeführt, in dem auch die beiden CoA-Thioester hinreichend stabil waren (Abb. 21, 1). Dabei wurde in mehreren Kontrollansätzen keine Enzymaktivität bzw. Zunahme der $A_{365\text{nm}}$ gemessen (Abb. 21, 3). Auch in Kontrollexperimenten, bei denen (*E*)-Phenylitaconyl-CoA nur mit gereinigter 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA Dehydrogenase versetzt war, wurde im Gegensatz zu vorhergehenden Arbeiten (C. Feil, 2006) keine Absorptionsabnahme bei 290 nm beobachtet (Daten nicht gezeigt). Die erhaltenen Daten zeigen, dass die Präparation nach Chromatographie an Hydroxyapatit keine unspezifische Hydratase-Aktivität mehr für (*E*)-Phenylitaconyl-CoA enthält und die Reaktion von gereinigter 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA Dehydrogenase abhängig ist.

Die Aktivität des Enzyms wurde durch den Zusatz von 5 mM EDTA zum Puffer nicht beeinträchtigt und zeigt, dass die Aktivität der 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA Dehydrogenase unabhängig von zweiwertigen Metallen ist (Daten nicht gezeigt).

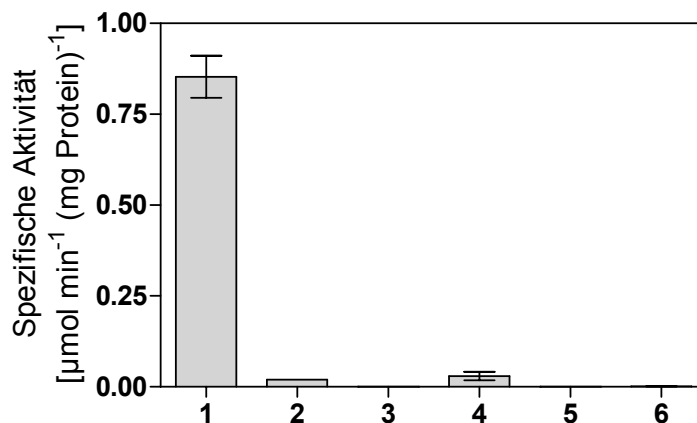


Abb. 21: Photometrischer Enzymtest zur Bestimmung der Aktivität gereinigter 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA Dehydrogenase in einem an die (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase gekoppelten Test. Gemessen wurde die Zunahme der $A_{365\text{nm}}$, um die 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA Dehydrogenase-abhängige Reduktion von NAD zu verfolgen. Der Standardansatz **1** enthielt in 50 mM MES/NaOH (pH 6,2) 50 μg (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase, 0,1 mg 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA Dehydrogenase, 500 μM NAD und 500 μM (*E*)-Phenylitaconyl-CoA. **2:** 1 ohne (*E*)-Phenylitaconyl-CoA. **3:** 1 ohne (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase. **4:** 1 ohne 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA Dehydrogenase. **5:** 1 ohne NAD. **6:** 1 ohne (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase und 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA Dehydrogenase. Dargestellt sind Mittelwerte dreier voneinander unabhängigen Messungen.

1.3.3 Produktnachweis über RP-HPLC

Der gekoppelte Enzymtest wurde mittels RP-HPLC auf die Entstehung eines Produktes untersucht (Material und Methoden 6.7.5). Von C. Feil (2006) wurde gezeigt, dass in Ansätzen mit gereinigter (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase und 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA Dehydrogenase nur 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA als Produkt entsteht, jedoch kein Benzoylsuccinyl-CoA. Da in dieser Arbeit die 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA Dehydrogenase über einen weiteren Chromatographieschritt gereinigt wurde, sollte eine mögliche Produktbildung nochmals untersucht werden. Da es keine Daten zum Elutionsverhalten von Benzoylsuccinyl-CoA gab, wurde zunächst auf Abnahme des Substrates und Entstehung eines Produktes analysiert. Tatsächlich wurde nach 15 Minuten Reaktionszeit bei gleichzeitiger Abnahme des Substrates (*E*)-Phenylitaconyl-CoA die Zunahme eines Produktes beobachtet, welches nach 6 bis 7 Minuten eluierte (Abb. 22, A und B). Auch das Produkt der (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase, 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA, wurde in den Reaktionsansätzen detektiert (Abb. 22, B). Das Produkt der 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA Dehydrogenase wurde in Kontrollansätzen ohne die jeweiligen Enzyme bzw. Substrate nicht beobachtet, womit sich dessen Bildung auf die Aktivität des Enzyms zurückführen lässt (siehe

Anhang, Tab. 29 A). Die erhaltenen Daten und das UV/Vis-Spektrum des Produktes (Abb. 23) stimmen mit den vorläufigen Untersuchungen von K. Hermuth (2002) überein, in denen die Bildung eines ähnlichen Produktes in der Rückreaktion der Benzoylsuccinyl-CoA-Thiolase

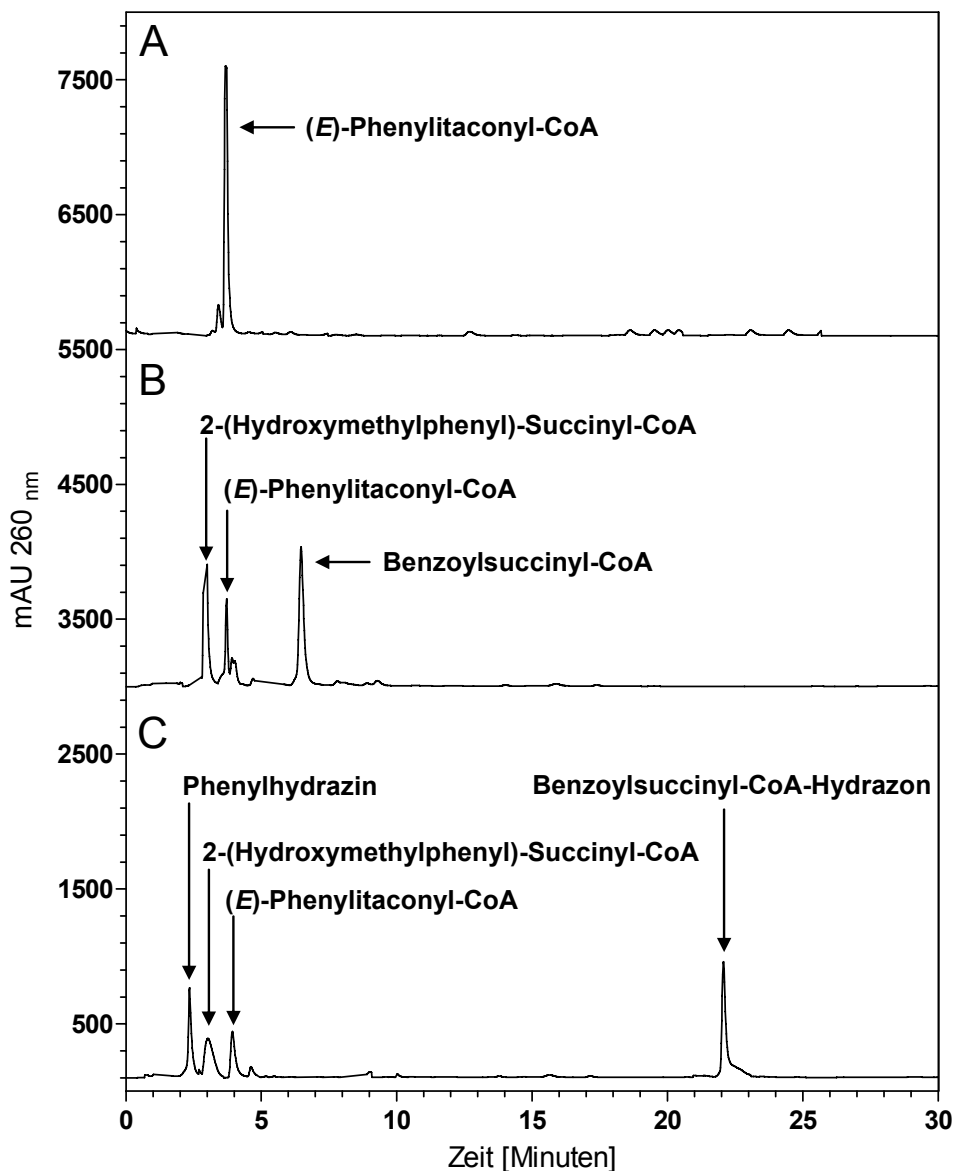


Abb. 22: Produkt-Analyse der Umsetzung von (E)-Phenylitaconyl-CoA im gekoppelten Enzymtest. Die Reaktionen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten mit Säure gestoppt und nach Entfernen der Proteinfraction der Überstand mittels RP-HPLC über einen linearen Gradienten von 3-20 % Acetonitril in 50 mM MES/NaOH (pH 6,2) mit UV-Detektion bei 260 nm analysiert. **A: Reaktion nach 0 Minuten.** Das Substrat (E)-Phenylitaconyl-CoA eluierte nach etwa 4 Minuten. **B: Reaktion nach 15 Minuten.** Nach 3 Minuten eluierte das Produkt der (E)-Phenylitaconyl Hydratase-Reaktion (2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA) und nach 6-7 Minuten das der 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA Dehydrogenase-Reaktion (Benzoylsuccinyl-CoA). **C: Reaktion nach 15 Minuten in Gegenwart von 750 µM Phenylhydrazin.** Benzoylsuccinyl-CoA reagiert mit Phenylhydrazin zu einem Benzoylsuccinyl-CoA-Hydrizon, das nach etwa 22 Minuten eluierte. Nicht umgesetztes Phenylhydrazin eluierte nach 2 Minuten. mAU: milli-absorbance unit.

beobachtet wurde. Es war jedoch nicht möglich, dieses Produkt über HPLC-MS zu identifizieren. Daher wurde zum Nachweis einer Ketogruppe im Reaktionsprodukt Phenylhydrazin zum Ansatz gegeben. Dabei wurde kein Benzoylsuccinyl-CoA mehr als Produkt detektiert, sondern ein neues Produkt, das wesentlich später eluierte (Abb. 22, C). In mehreren Kontrollansätzen wurde dieses Produkt nicht detektiert (siehe Anhang, Tab. 29 B). Dies zeigt, dass Phenylhydrazin mit dem entstandenen Benzoylsuccinyl-CoA zu einem Benzoylsuccinyl-CoA-Hydrazon reagiert, das unpolarer als Benzoylsuccinyl-CoA ist. Die erhaltenen Ergebnisse bestätigen also die Anwesenheit einer Ketogruppe im Produkt der von der 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA Dehydrogenase katalysierten Reaktion.

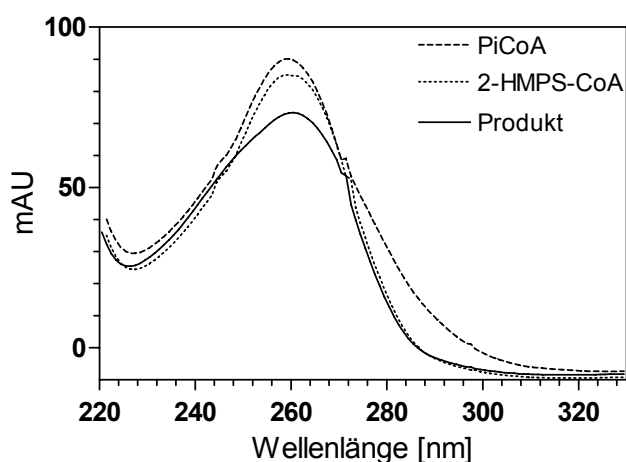


Abb. 23: UV/Vis-Spektrum des in der RP-HPLC-Analyse detektierten Produktes Benzoylsuccinyl-CoA. Das UV/Vis-Spektrum des Produktes Benzoylsuccinyl-CoA wurde während des HPLC-Laufes mit Hilfe eines Dioden-Array-Detektors aufgenommen. Es zeigt die für CoA-Thioester charakteristische Schulter bei 232 nm und ein Maximum bei 260 nm. Zum Vergleich sind die Spektren von (*E*)-Phenylitaconyl-CoA und 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA dargestellt. PiCoA: (*E*)-Phenylitaconyl-CoA; 2-HMPS-CoA: 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA; mAU: milli-absorbance unit.

1.3.4 Biochemische Charakterisierung der 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA Dehydrogenase

Bestimmung der apparenten Molekülmasse. Die native Molekülmasse gereinigter 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA-Dehydrogenase wurde durch Chromatographie an einer Gelfiltrationssäule und über Ferguson-Analyse nativer Polyacrylamidgele bestimmt (Material und Methoden 6.9.1 und 6.9.2).

Anhand der Eichgerade von Proteinen bekannter Massen wurde für die 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA Dehydrogenase über Gelfiltration bei einem

Elutionsvolumen von 212 ml eine Molekülmasse von $61 \text{ kDa} \pm 5 \text{ kDa}$ ermittelt (Abb. 24). Durch Ferguson-Analyse nativer Polyacrylamidgele wurde die Molekülmasse des Enzyms zu $58 \text{ kDa} \pm 3 \text{ kDa}$ bestimmt (Abb. 25, A und B). Dieser Wert stimmt gut mit der über Gelfiltration ermittelten Molekülmasse überein und bestätigt bei einer Untereinheitenzusammensetzung von 26 kDa (BbsC) und 28 kDa (BbsD) eine Komposition als Heterodimer ($\alpha\beta$).

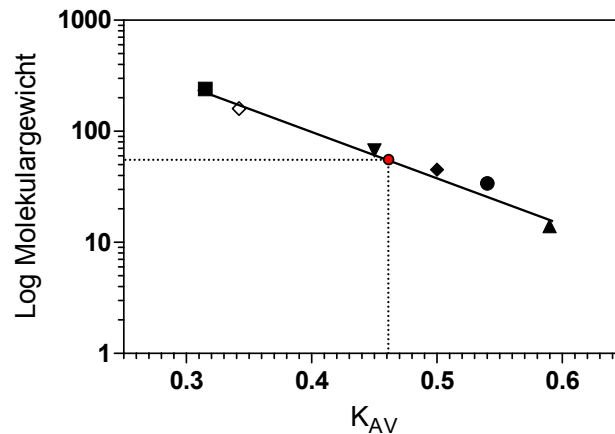


Abb. 24: Eichgerade zur Bestimmung der apparenten Molekülmasse der 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA Dehydrogenase. Die Bestimmung der Molekülmasse erfolgte über die Berechnung des Wertes K_{AV} , der anschließend gegen den Logarithmus des Molekulargewichtes (kDa) der Standardproteine aufgetragen wurde. Die Eichgerade wurde anhand folgender Standardproteine erstellt: ■: Katalase (240 kDa), ◇: Aldolase (160 kDa), ▼: Rinderserumalbumin (67 kDa), ◆: Ovalbumin (45 kDa), •: Lactat-Dehydrogenase (34 kDa), ▲: Lysozym (14 kDa), •: 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA Dehydrogenase ($61 \text{ kDa} \pm 5 \text{ kDa}$).

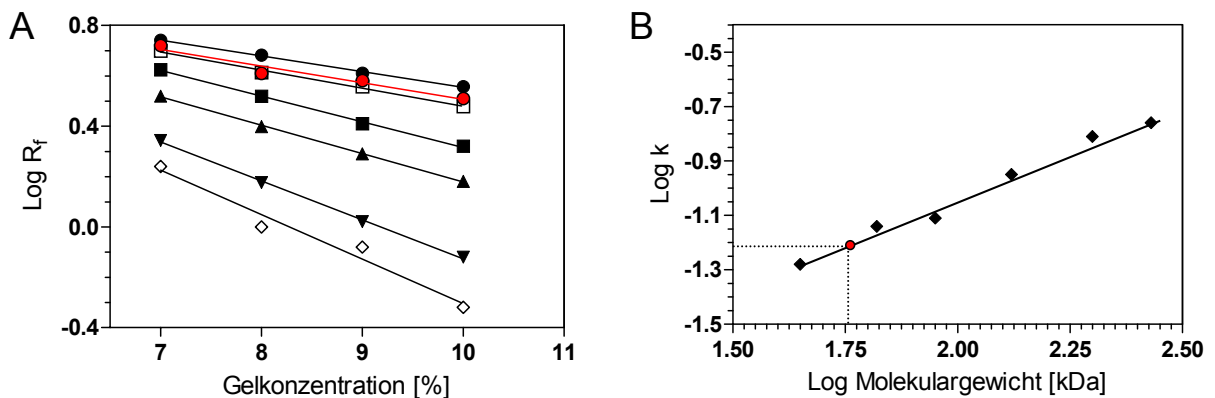


Abb. 25: Ferguson-Analyse zur Bestimmung der apparenten Molekülmasse gereinigter 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA Dehydrogenase. **A:** Auftrag der Logarithmen der relativen Laufstrecken (R_f) der Standardproteine sowie der 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA Dehydrogenase gegen die entsprechenden Polyacrylamidkonzentrationen der Gele und deren Ausgleichsgeraden. • Ovalbumin Monomer (45 kDa), □ BSA Monomer (67 kDa); ■ Ovalbumin Dimer (90 kDa), ▲ BSA Dimer (134 kDa); ▼ BSA Trimer (201 kDa); ◇ BSA Tetramer (268 kDa), • 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA Dehydrogenase. **B:** Eichgerade aus den Logarithmen der Beträge der Steigungen der Geraden (k) und den Logarithmen der Molekülmassen der Standardproteine. Daraus wurde die Molekülmasse der 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA Dehydrogenase zu $58 \text{ kDa} \pm 3 \text{ kDa}$ bestimmt (•).

UV/Vis-Spektrum. Von gereinigter 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA Dehydrogenase wurde ein UV/Vis-Spektrum in einem Wellenlängenbereich von 200-600 nm aufgenommen (Abb. 26). Es ist ein Absorptionspeak bei 280 nm zu erkennen, welcher durch die im Protein enthaltenen Aminosäuren verursacht wird. Weitere Absorptionsmaxima sind nicht vorhanden. Daraus lässt sich ableiten, dass die 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA Dehydrogenase keine absorbierenden Kofaktoren enthält. Der experimentell bestimmte Extinktionskoeffizient bei 280 nm des Enzyms liegt bei $15321 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Daten nicht gezeigt). Dieser Wert stimmt hinreichend mit dem aus dem Tryptophan- und Tyrosingehalt der 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA Dehydrogenase errechneten Extinktionskoeffizienten von $16650 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ überein.

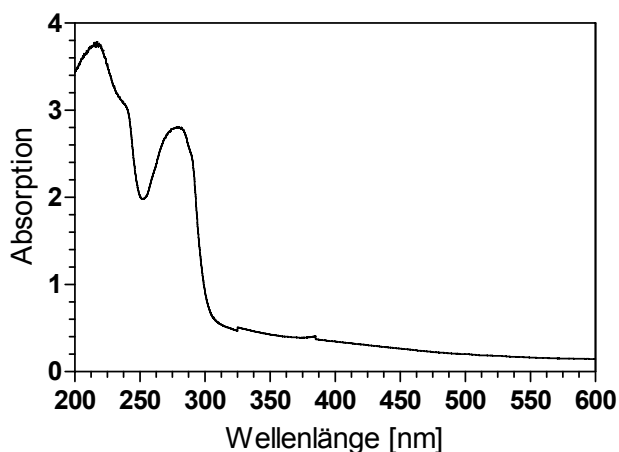


Abb. 26: UV/Vis-Spektroskopie von gereinigter 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA Dehydrogenase. Das Enzym lag in 10 mM Tris/HCl (pH 7,5) mit 100 mM KCl vor und das Spektrum wurde gegen den gleichen Puffer aufgenommen (Proteinkonzentration: $3,2 \text{ mg ml}^{-1}$).

Kinetik der 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA Dehydrogenase.

Enzymkinetische Parameter wurden im gekoppelten Enzymtest mit (*E*)-Phenylitaconyl-CoA als Substrat ermittelt (Material und Methoden 6.8.1). Dabei wurden verschiedene Konzentrationen des Substrates eingesetzt (25-400 μM) und die Zunahme der $A_{365\text{nm}}$ verfolgt. Die erhaltenen Datenreihen wurden mit dem Graphikprogramm Prism4.00 (GraphPad Software; La Jolla, CA, USA) graphisch dargestellt und durch nicht-lineare Regression analysiert. Da die Datenpunkte auf einen hyperbolischen Kurvenverlauf hinweisen, wurde die Michaelis-Menten-Gleichung (Gleichung 4) für die Kurvenanpassung zugrunde gelegt (Abb. 27).

$$v = \frac{V_{\max} \cdot [x]}{K_m + [x]}$$

Gleichung 4: Michaelis-Menten-Gleichung. V_{\max} : maximale Geschwindigkeit, K_m : Michaelis-Konstante, x : Substratkonzentration.

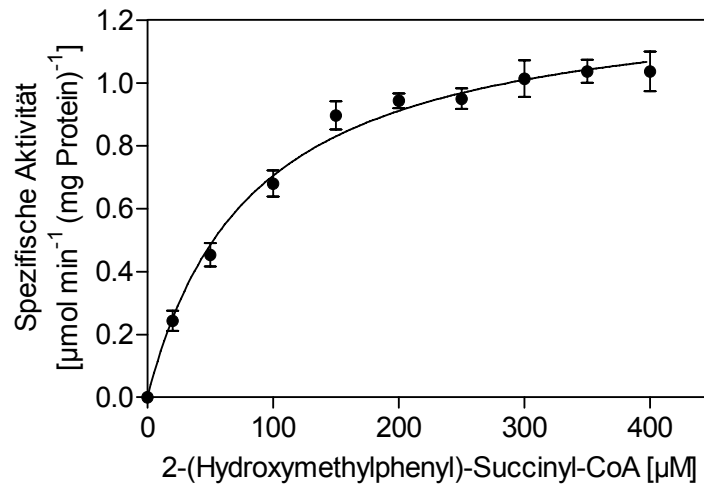


Abb. 27: Reaktionskinetik der 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA Dehydrogenase im gekoppelten Enzymtest mit (E)-Phenylitaconyl-CoA als Substrat. Zur Bestimmung von Enzymkinetischen Parametern wurde die Aktivität der 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA Dehydrogenase im gekoppelten Enzymtest bei Substratkonzentrationen von 25 μM bis 400 μM durch Zunahme der $A_{365\text{nm}}$ gemessen. Die erhaltenen Datenpunkte wurden gegen die Michaelis-Menten-Gleichung gefittet. Für die 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA Dehydrogenase wurde damit ein apparter K_m -Wert von $84 \pm 8 \mu\text{M}$ und ein V_{\max} von $1,2 \pm 0,1 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$ ermittelt (R^2 : 0,971). Dargestellt sind Mittelwerte von sechs voneinander unabhängigen Messungen.

1.4 Alternative Substrate der 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA Dehydrogenase

Viele Studien zeigen, dass Alkohol-Dehydrogenasen aus verschiedenen Mikroorganismen alternative Substrate stereospezifisch umsetzen (Hummel, 1997). Daher wurde untersucht, ob gereinigte 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA Dehydrogenase Acetophenon und dessen reaktivere Derivate (Chlor-substituierte Acetophenone, Abb. 28) umsetzt. Dies wurde über die Rückreaktion und Messung der Abnahme der $A_{365\text{nm}}$ durch die Oxidation von NADH verfolgt (Material und Methoden 6.7.3).

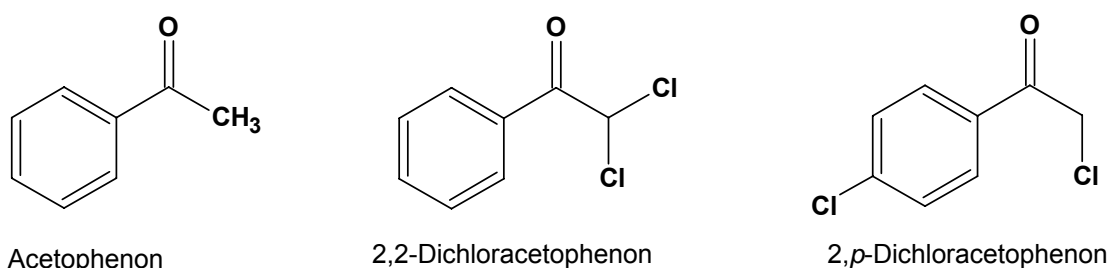


Abb. 28: Alternative Substrate der 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA-Dehydrogenase in der Rückreaktion. Gezeigt sind Strukturformeln von Acetophenon, 2,2-Dichloroacetophenon und 2,*p*-Dichloroacetophenon.

Dabei wurde beobachtet, dass die 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA Dehydrogenase die beiden Chlor-substituierten Acetophenone 2,2- bzw. 2,*p*-Dichloroacetophenon umsetzt, jedoch nicht Acetophenon. Die spezifische Aktivität lag bei $3,5 \pm 1 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$ für 2,2-Dichloroacetophenon und bei $7 \pm 1,5 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$ für 2,*p*-Dichloroacetophenon.

Zur Ermittlung enzymkinetischer Parameter wurden verschiedene Konzentrationen der jeweiligen alternativen Substrate (25-500 μM) eingesetzt und die Abnahme der $A_{365\text{nm}}$ verfolgt (Material und Methoden 6.8.1). Die erhaltenen Daten wurden graphisch dargestellt und durch nicht-lineare Regression analysiert (Prism4.00, GraphPad Software; La Jolla, CA, USA). Da die Datenpunkte der Umsetzung von 2,2- bzw. 2,*p*-Dichloroacetophenon einem sigmoidalen Kurvenverlauf folgen, wurde für die Anpassung dieser Datensätze die Hill-Gleichung (siehe Gleichung 2, Seite 61) verwendet (Abb. 29, A und B). Für die Umsetzung von 2,2-Dichloroacetophenon wurde ein Hill-Koeffizient von $N=4$ und für 2,*p*-Dichloroacetophenon ein N von 5 ermittelt, was im Widerspruch zu den Ergebnissen der Gelfiltration und nativen Polyacrylamidgelelektrophorese steht (siehe Ergebnisse 1.3.4).

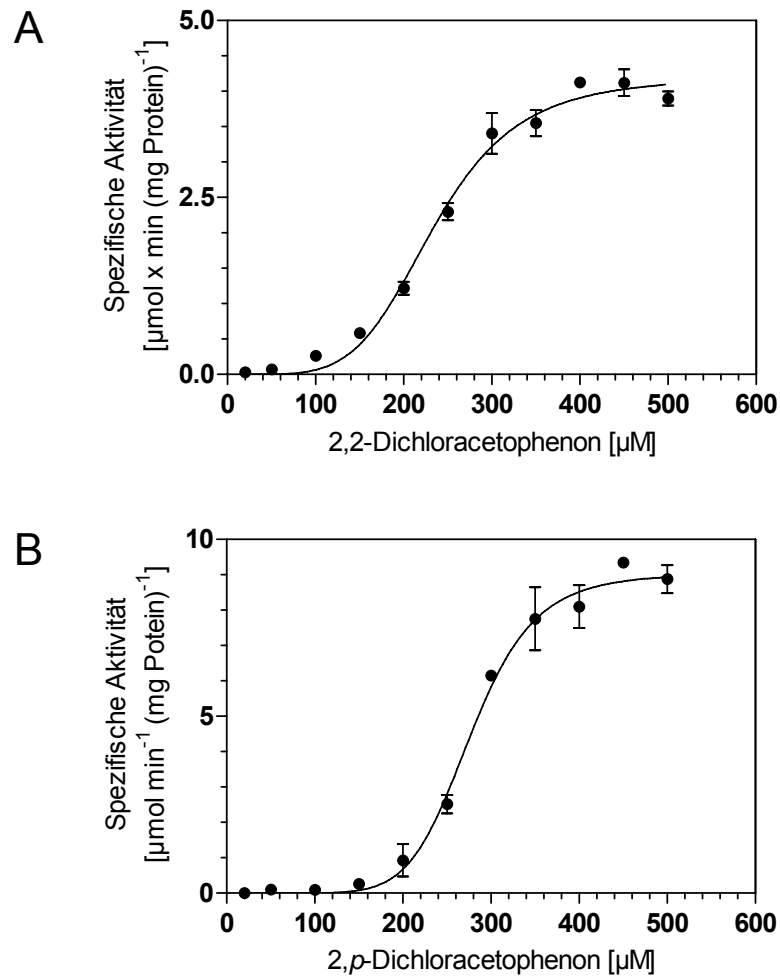


Abb. 29: Reaktionskinetik der 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA Dehydrogenase mit 2,2- bzw. 2,p-Dichloracetophenon als Substrat. Zur Bestimmung von enzymkinetischen Parametern wurde die Aktivität des Enzyms bei Substratkonzentrationen von jeweils 25-500 μM durch Abnahme der $A_{365\text{nm}}$ bestimmt. **A: Reaktionskinetik mit 2,2-Dichloracetophenon:** Nach Kurvenanpassung der Daten an die Hill-Gleichung wurden folgende Parameter ermittelt: ein Hill-Koeffizient von $N=4$, ein apparenter K_m -Wert von $241 \pm 11 \mu\text{M}$ und ein V_{max} von $4,25 \pm 0,3 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$ (R^2 : 0,971). **B: Reaktionskinetik mit 2,p-Dichloracetophenon:** Die Anpassung der Daten an die Hill-Gleichung ergab einen Hill-Koeffizienten $N=5$, einen apparenten K_m -Wert von $306 \pm 21 \mu\text{M}$ und ein V_{max} von $9 \pm 1 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$ (R^2 : 0,983). Dargestellt sind Mittelwerte von vier voneinander unabhängigen Messungen.

1.5 Reinigung und Charakterisierung der Benzoylsuccinyl-CoA-Thiolase

Im *bbs*-Operon von *T. aromatica* wurde das Gen *bbsB* gefunden, dessen Produkt hohe Sequenzhomologien zu bakteriellen β -Ketothiolasen zeigt (Leuthner und Heider, 2000; B. Leuthner, 1999). Daher wurde postuliert, dass dieses Enzym analog zum Fettsäure-Abbau bei der letzten Reaktion des β -Oxidationsweges von (*R*)-Benzylsuccinat Benzoylsuccinyl-CoA thiolytisch zu Benzoyl-CoA und Succinyl-CoA spaltet (Biegert et al., 1996). Das Enzym wurde bereits aus *T. aromatica* gereinigt und näher charakterisiert (K. Hermuth, 2002). Dabei wurde festgestellt, dass die Benzoylsuccinyl-CoA-Thiolase mit einem weiteren Protein eluiert, welches als BbsA identifiziert wurde. Wegen der sehr niedrigen Aktivitäten, der Labilität des Enzyms und schlechter Reproduzierbarkeit waren aus diesen Untersuchungen allerdings keine weitergehenden Ergebnisse erhalten worden. Für die weitere biochemische Untersuchung wurden deshalb die Gene *bbsA* und *bbsB* unter Kontrolle eines IPTG-induzierbaren Promotors in einen Überproduktionsvektor kloniert (K. Hermuth, 2002), mit dem in dieser Arbeit die Benzoylsuccinyl-CoA-Thiolase rekombinant hergestellt, gereinigt und biochemisch charakterisiert wurde.

1.5.1 Überproduktion und Reinigung der Benzoylsuccinyl-CoA-Thiolase

Die Benzoylsuccinyl-CoA-Thiolase BbsB wurde zusammen mit BbsA wie in Material und Methoden 6.1 beschrieben in *E. coli* DH5 α überproduziert und anschließend unter aeroben Bedingungen über zwei Chromatographieschritte gereinigt (Material und Methoden 6.2.3). Nach dem ersten Chromatographieschritt an DEAE-Sepharose wurde beobachtet, dass die beiden rekombinanten Proteine voneinander getrennt wurden. Beide Proteine wurden dann separat über einen weiteren Chromatographieschritt an Hydroxyapatit aufgereinigt (Material und Methoden 6.2.3). Zur Bestimmung der Enzymaktivität der Benzoylsuccinyl-CoA-Thiolase wurde die Synthese von Benzoylsuccinyl-CoA aus Benzoyl-CoA und Succinyl-CoA (Rückreaktion) gemessen, wobei die gereinigten Proteine separat und in Mischung eingesetzt wurden (Material und Methoden 6.7.4). Aufgrund der Anwesenheit von Thioesterasen im Zellextrakt und in den DEAE-Sepharose-Fractionen konnte damit noch keine Aktivität gemessen werden (siehe Tabelle 24).

Anionenaustauschchromatographie an DEAE-Sepharose. Zellextrakte mit den beiden überproduzierten Proteinen wurden auf eine DEAE-Sepharose-Säule aufgetragen. Bei einer Stufe mit 80 mM KCl eluierten beide Untereinheiten (Daten nicht gezeigt). BbsA eluierte bei einer KCl-Konzentration von 300 mM, die Thiolase-Untereinheit BbsB bei 500 mM KCl (Daten nicht gezeigt). Abbildung 30 zeigt ein SDS-Polyacrylamidgel, auf das die Enzym-haltigen Fraktionen nach diesem Chromatographieschritt aufgetragen wurden.

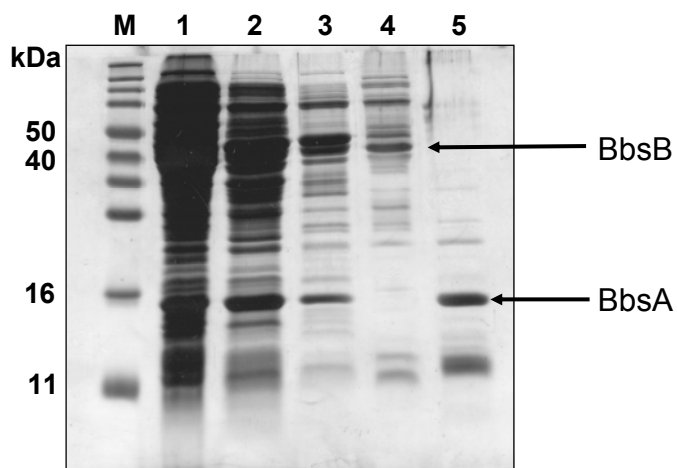


Abb. 30: SDS-Reinigungsgel der Thiolase-Untereinheit BbsB und der kleinen Untereinheit BbsA nach Anionenaustauschchromatographie an DEAE-Sepharose. Der obere Pfeil markiert die Bande der überproduzierten 41 kDa großen Benzoylsuccinyl-CoA-Thiolase (BbsB), der untere Pfeil die der kleinen Untereinheit BbsA (16 kDa). Ganze Zellen von *E. coli* DH5 α mit pTrc99A-*bbsAB* vor und nach Induktion mit 1mM IPTG, sowie die Proben der BbsA- und BbsB-enthaltenden Fraktionen nach dem Chromatographieschritt wurden über ein 15%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Färbung erfolgte mit Coomassie-Blau. **M:** Molekularmassenstandard. **1:** Ganze Zellen von *E. coli* vor Induktion mit 1 mM IPTG. **2:** Ganze Zellen von *E. coli* nach Induktion mit 1 mM IPTG. **3:** DEAE-Sepharose-Fraktion, Stufe 80 mM KCl. **4:** DEAE-Fraktion, Stufe 500 mM KCl. **5:** DEAE-Fraktion, Stufe 300 mM KCl.

Chromatographie an Hydroxyapatit. Die nach Chromatographie an DEAE-Sepharose gesammelten Fraktionen mit BbsA bzw. Benzoylsuccinyl-CoA-Thiolase (BbsB) wurden separat über Chromatographie an Hydroxyapatit weiter gereinigt. Die Thiolase-Untereinheit BbsB eluierte in einem linearen Gradienten bei einer Kaliumphosphatkonzentration zwischen 150 und 200 mM (Daten nicht gezeigt). In einem linearen Gradienten von 0-300 mM Kaliumphosphat eluierte das BbsA-Protein zwischen 80 und 120 mM Kaliumphosphat (Daten nicht gezeigt). In Abbildung 31 sind zwei SDS-Polyacrylamidgele gezeigt, auf welche jeweils die BbsB- (Abb. 31, A) bzw. BbsA- (Abb. 31, B) haltigen Fraktionen nach der Chromatographie an Hydroxyapatit aufgetragen wurden. Aktivität als „Benzoylsuccinyl-CoA-Synthase“ konnte nach diesem Schritt nur bestimmt werden, wenn die gereinigten Proteine

BbsA und BbsB zusammengegeben wurden. Dabei wurde eine spezifische Aktivität von $8 \pm 1 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$ gemessen. Dies war ein erster Hinweis auf eine Anhängigkeit der Thiolase-Untereinheit BbsB von der kleinen Untereinheit BbsA.

Aus 9,3 g Zellen (765 mg lösliches Gesamtprotein) wurden insgesamt 17 mg gereinigtes Protein (9 mg BbsB und 8 mg BbsA) erhalten. Das entspricht damit 2,3 % des löslichen Gesamtproteins der überproduzierenden Zellen.

Tab. 24: Reinigungstabelle der Thiolase-Untereinheit BbsB und der kleinen Untereinheit BbsA. Aufgrund der Anwesenheit von Thioesterasen im Zellextrakt konnte die Aktivität von BbsB und BbsA als Benzoylsuccinyl-CoA-Thiolase erst nach Chromatographie an Hydroxyapatit bestimmt werden. Die Ausbeute (BbsA und BbsB) bezieht sich auf den Gesamtproteingehalt im Zellextrakt. n. b.: nicht bestimmt.

Fraktion	Protein [mg]		Aktivität ¹	Spezifische Aktivität ²	Anreicherung [fach]	Ausbeute [%]
	BbsB	BbsA				
Extrakt	765		n. b.	n. b.	n. b.	n. b.
DEAE	131	186	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.
Hydroxyapatit	9	8	130	8	n.b.	2,3

¹ [$\mu\text{mol min}^{-1}$]

² [$\mu\text{mol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$]

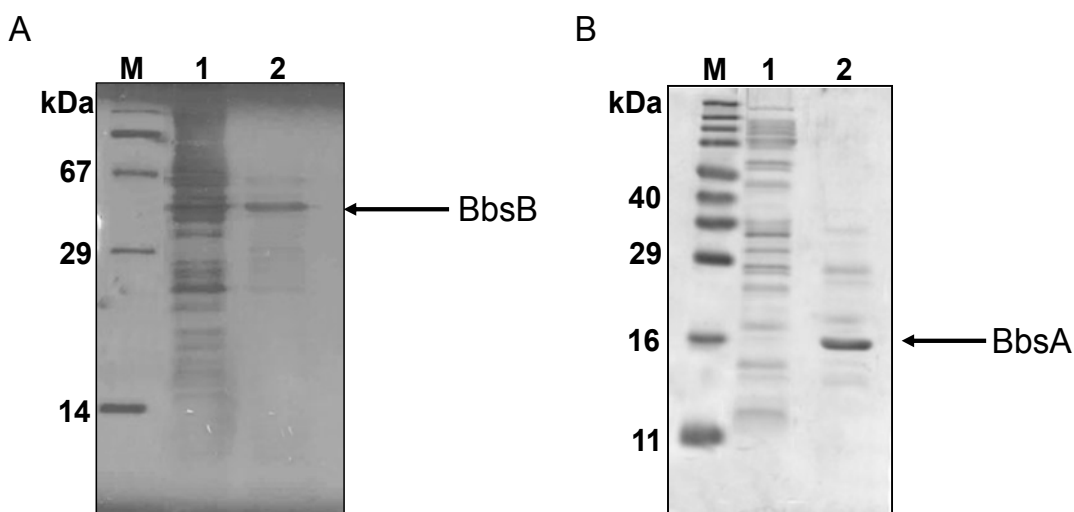


Abb. 31: SDS-Reinigungsgele der Thiolase-Untereinheit BbsB (A) und der kleinen Untereinheit BbsA (A) nach Chromatographie an Hydroxyapatit. Fraktionen, die nach Chromatographie an Hydroxyapatit Benzoylsuccinyl-CoA-Thiolase (BbsB) bzw. BbsA enthielten, wurden über ein 15%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Anschließend erfolgte eine Färbung mit Coomassie-Blau. **A: Benzoylsuccinyl-CoA-Thiolase (BbsB).** M: Molekularmassenstandard. 1: Durchlauf. 2: Hydroxyapatit-Fraktion (150-200 mM Kaliumphosphat). **B: BbsA.** M: Molekularmassenstandard. 1: Durchlauf. 2: Hydroxyapatit-Fraktion (80-120 mM Kaliumphosphat).

1.5.2 Produktnachweis über RP-HPLC

Das Substrat der Benzoylsuccinyl-CoA-Thiolase, Benzoylsuccinyl-CoA, ist weder kommerziell noch durch einfache chemische Synthese zugänglich. Aus diesem Grund wurde die Aktivität des Enzyms durch Messen der Rückreaktion, nämlich der Kondensation von Benzoyl-CoA und Succinyl-CoA zu Benzoylsuccinyl-CoA und Coenzym A nachgewiesen. Die zeitabhängige Produktbildung wurde über RP-HPLC nachgewiesen (Material und Methoden 6.7.5) und die dabei eingesetzten Substrate Benzoyl-CoA und Succinyl-CoA wurden chemisch synthetisiert und auf ihre Reinheit analysiert (Material und Methoden 7.2). Zuerst wurde die Abhängigkeit der Produktbildung vom pH-Wert untersucht und ein pH-Optimum der Reaktion bei pH 6,2 ermittelt (Daten nicht gezeigt). Deshalb wurden die Reaktionen standardmäßig in 50 mM MES/NaOH pH 6,2 durchgeführt, in dem auch die beiden CoA-Thioester Benzoyl-CoA und Succinyl-CoA hinreichend stabil waren.

Nach 15 Minuten Reaktionszeit wurde bei gleichzeitiger Abnahme der Substrate ein Produkt detektiert, das nach etwa 6 Minuten eluierte und dessen Bildung abhängig von der Anwesenheit beider Proteine BbsA und BbsB war (Abb. 32, A und B). Die Elutionsposition und das UV/Vis-Spektrum des Produktes (Abb. 33) stimmen mit den Parametern des Produktes überein, welches im gekoppelten Enzymtest der 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA Dehydrogenase detektiert wurde (siehe Ergebnisse 1.3.3). In verschiedenen Kontrollansätzen wurde das Produkt mit dem oben beschriebenen Elutionsverhalten nicht beobachtet (siehe Anhang, Tab. 30 A). Dies zeigt, dass dessen Bildung auf die Aktivität der beiden Untereinheiten BbsB und BbsA zurückzuführen ist. Bei Reaktionsansätzen mit 750 μ M Phenylhydrazin wurde nach 15 Minuten Reaktionszeit ein Produkt detektiert, das erst nach 22 Minuten eluierte (Abb. 32, C). Auch hier stimmt die Elutionszeit und das UV/Vis-Spektrum (Abb. 33) der Verbindung mit den erhaltenen Daten des Hydrazons überein, das im Enzymtest der 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA Dehydrogenase beobachtet wurde (siehe Ergebnisse 1.3.3). Da in mehreren Kontrollansätzen kein Produkt mit einer Elutionszeit von 22 Minuten beobachtet wurde (siehe Anhang, Tab. 30 B), bekräftigen diese Ergebnisse die Annahme einer Ketogruppe im Substrat der Benzoylsuccinyl-CoA-Thiolase-Reaktion und weisen die Benzoylsuccinyl-CoA-Thiolase als neuartiges Enzym aus, dessen Aktivität von der Anwesenheit einer weiteren kleinen Untereinheit (BbsA) abhängt. Im weiteren Verlauf der Arbeit werden die Proteine BbsB und BbsA daher als Benzoylsuccinyl-CoA-Thiolase bezeichnet.

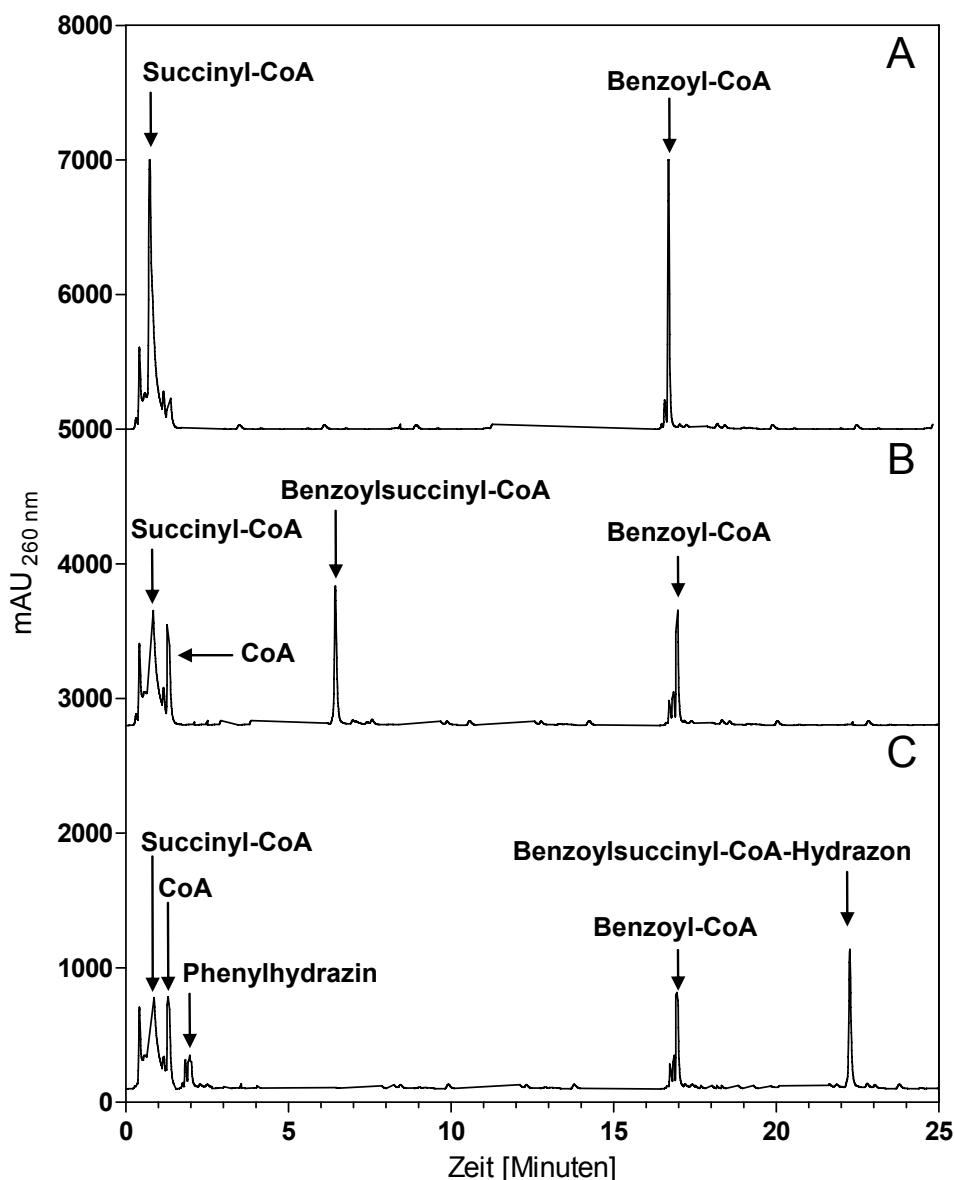


Abb. 32: Produkt-Analyse der Umsetzung Benzoyl-CoA und Succinyl-CoA durch die gereinigte Benzoylsuccinyl-CoA-Thiolase (BbsA und BbsB). Die Reaktion wurde nach verschiedenen Zeitpunkten mit Säure gestoppt und nach Entfernen der Proteinfraction der Überstand mittels RP-HPLC über einen linearen Gradienten von 3-20 % Acetonitril in 50 mM MES/NaOH (pH 6,2) mit UV-Detektion bei 260 nm analysiert. **A: Reaktion nach 0 Minuten.** Die Substrate Succinyl-CoA und Benzoyl-CoA eluierten nach 0,5 bzw. 17 Minuten, **B: Reaktion nach 15 Minuten.** Nach 6 bis 7 Minuten eluierte das Produkt Benzoylsuccinyl-CoA, CoA nach 1,5 Minuten. **C: Reaktion nach 15 Minuten in Gegenwart von 750 μM Phenylhydrazin.** Die Ketogruppe des Produktes Benzoylsuccinyl-CoA reagiert mit Phenylhydrazin zu einem Hydrazon, das nach 22 Minuten eluierte. Nicht umgesetztes Phenylhydrazin eluierte nach 2 Minuten. mAU: milli-absorbance unit.

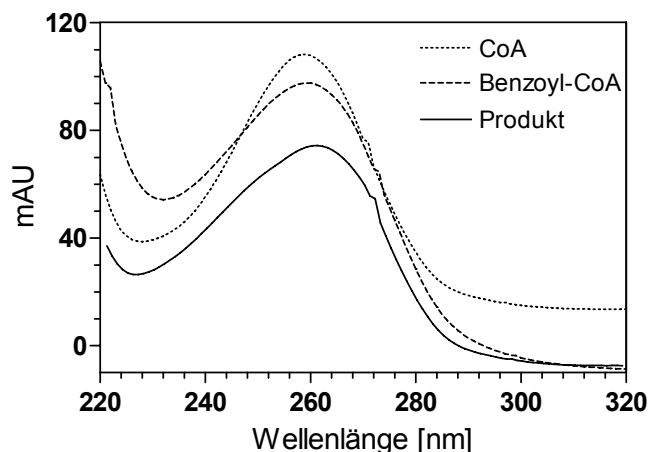


Abb. 33: UV/Vis-Spektrum des in der RP-HPLC-Analyse detektierten Produktes Benzoylsuccinyl-CoA. Das UV/Vis-Spektrum des Produktes Benzoylsuccinyl-CoA wurde während des Laufes mit Hilfe eines Dioden-Array-Detektors aufgenommen. Es zeigt die für CoA-Thioester charakteristische Schulter bei 232 nm und ein Maximum bei 260 nm. Die Spektren von freiem CoA und Benzoyl-CoA sind zum Vergleich gezeigt. mAU: milli-absorbance unit.

1.5.3 Photometrischer Test zum Nachweis der Enzymaktivität der Benzoylsuccinyl-CoA-Thiolase

Das über RP-HPLC detektierte Benzoylsuccinyl-CoA-Hydrazon (Ergebnisse 1.5.2) weist im UV/Vis-Spektrum eine charakteristische Absorption bei einer Wellenlänge zwischen 290 und 320 nm auf (Abb. 34). Durch Absorptionsdifferenzspektren wurde in diesem Bereich ein Maximum bei 312 nm ermittelt (Daten nicht gezeigt). Dies wurde zur Entwicklung eines photometrischen Tests für die Benzoylsuccinyl-CoA-Thiolase ausgenutzt, indem die Bildung des Ketons durch das Enzym über die Zunahme der Absorption bei 312 nm ($A_{312\text{nm}}$) verfolgt wurde (Material und Methoden 6.7.4). Für das Benzoylsuccinyl-CoA-Hydrazon wurde ein Extinktionskoeffizient bei 312 nm von $6300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ermittelt (Daten nicht gezeigt). Dieser basiert auf der Differenz der Absorption des Hydrazons im Vergleich zu Benzoyl-CoA bei einer Wellenlänge von 312 nm und unter der Annahme, dass die Absorption des Hydrazons bei 260 nm identisch zu der von Benzoyl-CoA ist ($21100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; Webster et al., 1974).

Tatsächlich wurde in Ansätzen mit gereinigter Benzoylsuccinyl-CoA-Thiolase eine Zunahme der $A_{312\text{nm}}$ beobachtet und eine spezifische Aktivität von durchschnittlich $8 \pm 1 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$ ermittelt (Abb. 35, 1). In verschiedenen Kontrollansätzen wurde keine Enzymaktivität bzw. Zunahme der $A_{312\text{nm}}$ gemessen (Abb. 35, 2-9). Die Benzoylsuccinyl-CoA-Thiolase katalysiert also die Kondensation von Benzoyl-CoA und Succinyl-CoA zu

Benzoylsuccinyl-CoA, welches zu einem Hydrazone umgesetzt und bei $A_{312\text{nm}}$ photometrisch nachgewiesen wurde.

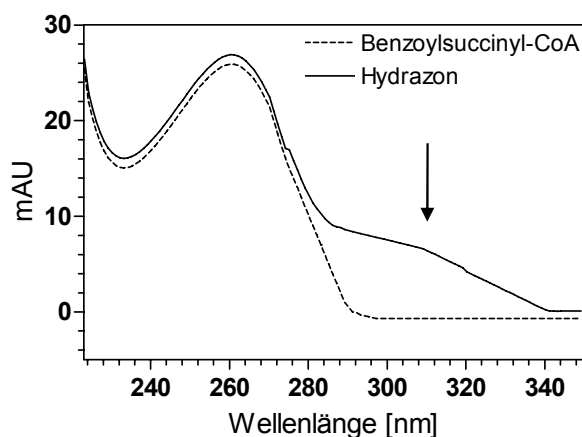


Abb. 34: UV/Vis-Spektrum des in der RP-HPLC-Analyse detektierten Benzoylsuccinyl-CoA-Hydrazons. Das Benzoylsuccinyl-CoA-Hydrazone zeigt im UV/Vis-Spektrum eine charakteristische Absorption zwischen 290 und 320 nm (Pfeil), die im Produkt der Rückreaktion der Benzoylsuccinyl-CoA-Thiolase (Benzoylsuccinyl-CoA) fehlt. mAU: milli-absorbance unit.

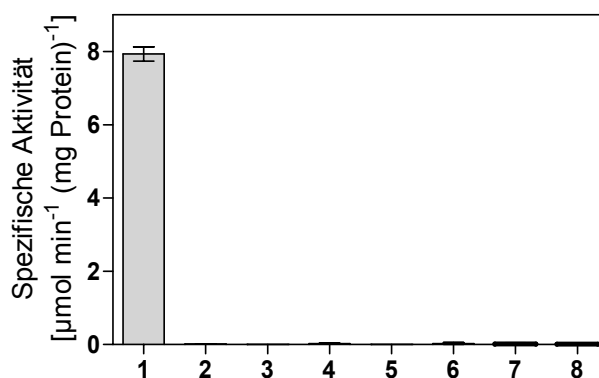


Abb. 35: Photometrischer Enzymtest zur Bestimmung der Aktivität gereinigter Benzoylsuccinyl-CoA-Thiolase in der Rückreaktion. Gemessen wurde die Zunahme der $A_{312\text{nm}}$, um die Benzoylsuccinyl-CoA-Thiolase-abhängige Bildung des Ketons Benzoylsuccinyl-CoA verfolgen zu können. Der Standardansatz **1** enthielt in 50 mM MES/NaOH (pH 6,2) beide Untereinheiten der Benzoylsuccinyl-CoA-Thiolase (jeweils 50 μg), jeweils 250 μM Benzoyl-CoA und Succinyl-CoA sowie 750 μM Phenylhydrazin. Kontrollansätze: **2**: 1 ohne BbsB. **3**: 1 ohne BbsA. **4**: 1 ohne BbsA und BbsB. **5**: 1 ohne Benzoyl-CoA. **6**: 1 ohne Succinyl-CoA. **7**: 1 ohne Benzoyl-CoA und Succinyl-CoA. **8**: 1 ohne Phenylhydrazin. Dargestellt sind Mittelwerte von vier voneinander unabhängigen Messungen.

1.5.4 Biochemische Charakterisierung der Benzoylsuccinyl-CoA-Thiolase

Bestimmung der apparenten Molekülmassen. Die nativen Molekülmassen der beiden gereinigten Untereinheiten der Benzoylsuccinyl-CoA-Thiolase wurden über Gelfiltrations-Chromatographie und Ferguson-Analyse nativer Polyacrylamidgele bestimmt (Material und Methoden 6.9.1 und 6.9.2).

Die Molekülmasse der Thiolase-Untereinheit BbsB wurde über Gelfiltration zu $91 \text{ kDa} \pm 7 \text{ kDa}$ (Elutionsvolumen: 195 ml), die der kleinen Untereinheit BbsA zu $31 \pm 4 \text{ kDa}$ bestimmt (Elutionsvolumen: 254 ml; siehe Abb. 36, A und B).

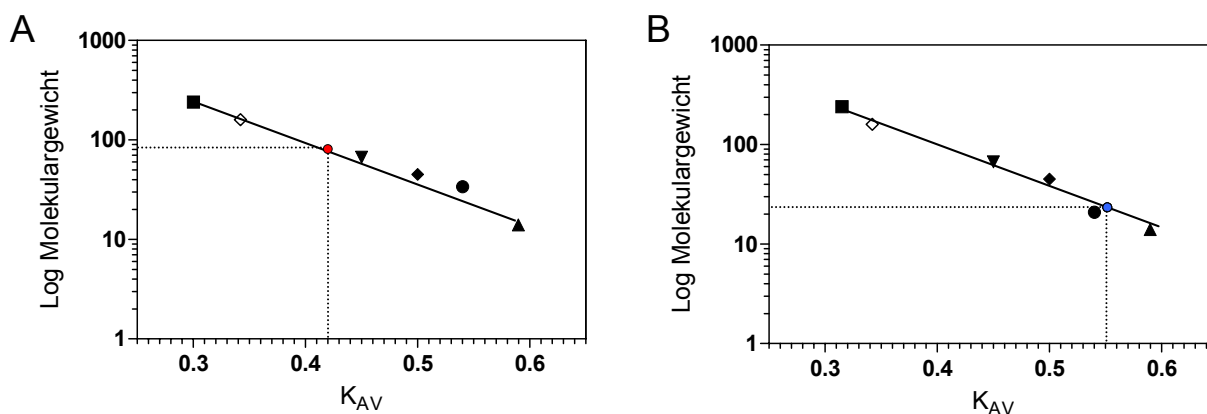


Abb. 36: Eichgeraden zur Bestimmung der apparenten Molekülmasse gereinigter Benzoylsuccinyl-CoA-Thiolase. A und B: Die Bestimmung der Molekülmassen von BbsB und BbsA erfolgte über die Berechnung des K_{AV} -Wertes, der anschließend gegen den Logarithmus des Molekulargewichtes (kDa) der Standardproteine aufgetragen wurde. Die Eichgerade wurde anhand folgender Standardproteine erstellt: ■: Katalase (240 kDa), ◇: Aldolase (160 kDa), ▼: Rinderserumalbumin (67 kDa), ◆: Ovalbumin (45 kDa), ●: Lactat-Dehydrogenase (34 kDa), ▲: Lysozym (14 kDa). **A:** ● Untereinheit BbsB ($91 \text{ kDa} \pm 7 \text{ kDa}$) **B:** ● kleine Untereinheit BbsA ($31 \pm 4 \text{ kDa}$).

Die Ferguson-Analyse nativer Polyacrylamidgele ergab für die BbsB-Untereinheit eine Molekülmasse von $77 \pm 3 \text{ kDa}$ (Abb. 37, A und B). Im Vergleich mit den Ergebnissen der Gelfiltration entspricht dies bei einer Untereinheit von 41 kDa einer α_2 -Komposition. Für die kleine Untereinheit BbsA wurde über die Ferguson-Analyse eine Masse von $47 \pm 5 \text{ kDa}$ (Abb. 37, A und B) ermittelt, was gut mit den Ergebnissen der Gelfiltration übereinstimmt und einer Komposition als Dimer (α_2) mit einer Untereinheit von jeweils 16 kDa entspricht.

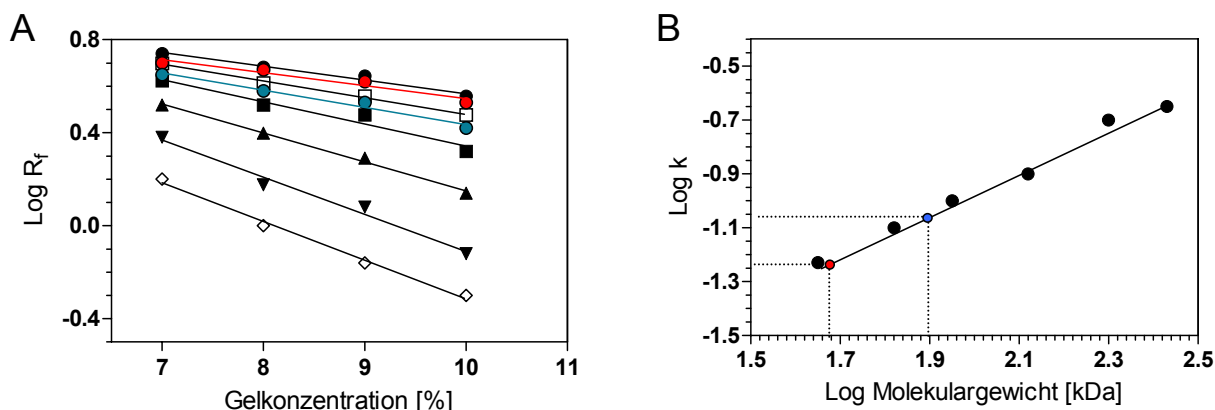


Abb. 37: Ferguson-Analyse zur Bestimmung der apparenten Molekülmasse gereinigter Untereinheiten der Benzoylsuccinyl-CoA-Thiolase. **A:** Auftrag der Logarithmen der relativen Laufstrecken (R_f) der Standardproteine sowie der Thiolase-Untereinheit BbsB bzw. BbsA gegen die entsprechenden Polyacrylamidkonzentrationen der nativen Gele und deren Ausgleichsgeraden. ● Ovalbumin Monomer (45 kDa), □ BSA Monomer (67 kDa); ■ Ovalbumin Dimer (90 kDa), ▲ BSA Dimer (134 kDa); ▼ BSA Trimer (201 kDa); ◇ BSA Tetramer (268 kDa), ● BbsB, ● BbsA. **B:** Eichgerade aus den Logarithmen der Beträge der Steigungen der Ausgleichsgeraden (k) und den Logarithmen der Molekülmassen der Standardproteine. Daraus wurde die Molekülmasse der beiden Untereinheiten bestimmt. ● Untereinheit BbsB (77 ± 3 kDa), ● kleine Untereinheit BbsA (47 ± 5 kDa).

UV/Vis-Spektrum. Von den gereinigten Thiolase-Untereinheiten BbsB und BbsA wurde ein UV/Vis-Spektrum in einem Bereich von 200 bis 600 nm aufgenommen (Abb. 38; A und B). Das Spektrum von BbsB (Abb. 38, A) zeigt einen Absorptionspeak bei 280 nm, welcher durch die im Protein enthaltenen Aminosäuren verursacht wird. Weitere Absorptionsmaxima sind nicht vorhanden. Die Thiolase-Untereinheit BbsB enthält also keinen absorbierenden Kofaktor. Der experimentell bestimmte Extinktionskoeffizient des Enzyms bei 280 nm lag bei einer angenommenen Zusammensetzung von α_2 bei $83321 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Daten nicht gezeigt). Dieser Wert stimmt mit dem aus dem Tryptophan- und Tyrosingehalt von BbsB errechneten Extinktionskoeffizienten bei einer α_2 -Komposition überein ($80321 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Die gereinigte kleine Untereinheit BbsA zeigt im UV/Vis-Spektrum neben dem Maximum bei 280 nm keine weiteren Absorptionsmaxima, die auf einen absorbierenden Kofaktor hinweisen (Abb. 38, B). Der theoretische Extinktionskoeffizient des Enzyms bei 280 nm betrug $28384 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ und stimmt gut mit dem experimentell bestimmten Extinktionskoeffizienten von $34685 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (α_2 -Komposition) überein (Daten nicht gezeigt).

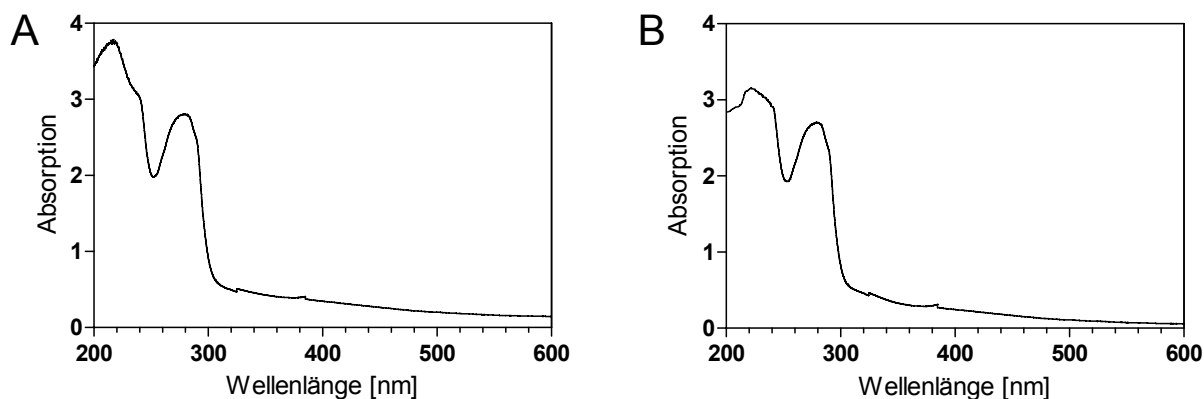


Abb. 38: UV/Vis-Spektroskopie mit gereinigten Untereinheiten der Benzoylsuccinyl-CoA-Thiolase. A und B: Die Untereinheiten BbsB und BbsA lagen jeweils in 10 mM Tris/HCl pH 7,5; 100 mM KCl vor und die Spektren wurden gegen den gleichen Puffer aufgenommen. A: Untereinheit BbsB ($2,1 \text{ mg ml}^{-1}$); B: kleine Untereinheit BbsA ($3,5 \text{ mg ml}^{-1}$).

Kinetik der Benzoylsuccinyl-CoA-Thiolase. Die Kinetik für die Rückreaktion der Benzoylsuccinyl-CoA-Thiolase wurde im photometrischen Enzymtest mit Benzoyl-CoA und Succinyl-CoA als Substrate ermittelt (Material und Methoden 6.8.1). Dazu wurden konstante Konzentrationen von Benzoyl-CoA ($50\text{--}500 \mu\text{M}$) und variierte Konzentrationen von Succinyl-CoA ($50, 100$ und $250 \mu\text{M}$) und umgekehrt eingesetzt. Die dabei erhaltenen Datenreihen wurden mit dem Graphikprogramm Prism4.00 (GraphPad Software; La Jolla, CA, USA) graphisch dargestellt und durch nicht-lineare Regression analysiert. Da die Datenpunkte auf einen hyperbolischen Kurvenverlauf hinweisen, wurde die Michaelis-Menten-Gleichung (Gleichung 4, Seite 75) für die Kurvenanpassung zugrunde gelegt (Abb. 39, A und B). Die jeweiligen V_{\max} - und K_m -Werte wurden durch mathematische Anpassung der Messdaten an die Zwei-Substrat-Kinetik nach einem Ping-Pong-Mechanismus ermittelt, was in der Diskussion 1.3 näher erläutert wird.

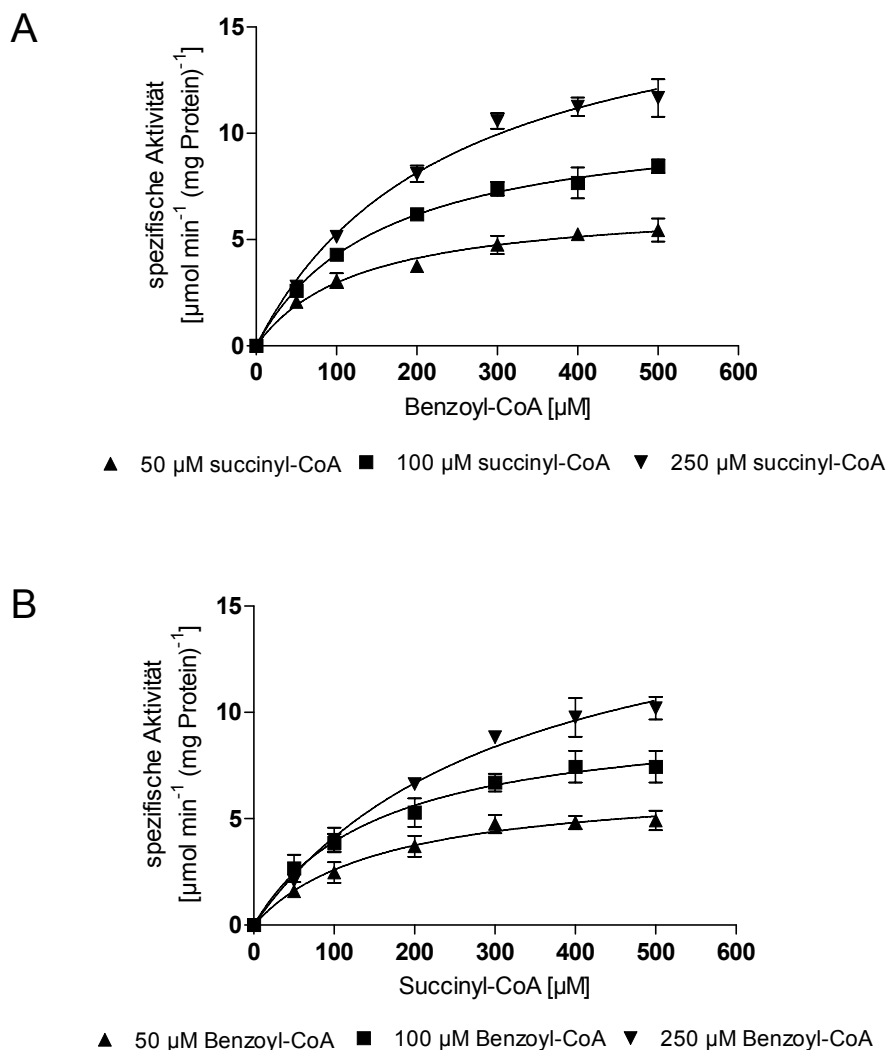


Abb. 39: Reaktionskinetik der Benzoylsuccinyl-CoA-Thiolase in der Rückreaktion. Die Aktivität der Benzoylsuccinyl-CoA-Thiolase wurde bei konstanten Benzoyl-CoA- und variierten Succinyl-CoA-Konzentrationen und umgekehrt durch Zunahme der $A_{312\text{nm}}$ gemessen. Die erhaltenen Datenpunkte wurden gegen die Michaelis-Menten-Gleichung gefittet. **A:** Experimente mit konstanten Benzoyl-CoA- (50 bis 500 μM) und variierten Succinyl-CoA-Konzentrationen (50, 100, 250 μM). **B:** Experimente mit konstanten Succinyl-CoA- (50 bis 500 μM) und variierten Benzoyl-CoA-Konzentrationen (50, 100, 250 μM). Dargestellt sind Mittelwerte von vier voneinander unabhängigen Messungen.

Photometrischer Nachweis von Zink. Die Sequenz der kleinen Untereinheit der Benzoylsuccinyl-CoA-Thiolase BbsA enthält ein Zink-Finger-Motiv (CxxC-X₁₀-CxxC). Deshalb wurde untersucht, ob das Protein gebundene Zink-Ionen enthält. Dazu wurden die Zink-Ionen aus den Proteinen aus zwei unabhängigen Präparationen extrahiert und nach einem modifizierten Protokoll von Ghasemi et al. (2003) mit Zincon nachgewiesen (Material und Methoden 8.3). Die erhaltenen Ergebnisse wurden auf den molaren Gehalt von Zink pro Untereinheit von BbsA umgerechnet (Daten nicht gezeigt). Dabei wurde ein Gehalt von $0,7 \pm$

0,1 Zink/Monomer bzw. $1,3 \pm 0,2$ Zink/Monomer bei den untersuchten Präparationen festgestellt.

2. Untersuchungen zur (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase

Die einleitende Reaktion beim Toluolabbau in *T. aromatica* ist die Addition der Methylgruppe des Toluols an die Doppelbindung eines Fumarat-Kosubstrates. Das Produkt dieser Reaktion ist (*R*)-Benzylsuccinat. Diese Reaktion wird von der (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase katalysiert, einem Glycyl-Radikalenzym (Leuthner et al., 1998). Um das katalytisch wirksame Glycylradikal nach der Translation in die (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase einzuführen, ist die Reaktion eines aktivierenden Enzyms notwendig (Leuthner et al., 1998). Die Gene, welche für die drei Untereinheiten der (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase in *T. aromatica* kodieren, wurden von B. Leuthner (1999) in einen Überexpressionsvektor kloniert. Von J. Hogg (2008) wurde das Konstrukt so verändert, dass das überproduzierte Protein am N-Terminus der α -Untereinheit einen Strep-Tag besitzt.

In dieser Arbeit wurde die (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase mit anfusioniertem Strep-Tag in *E. coli* überproduziert, gereinigt und die Aktivierbarkeit des rekombinanten Enzyms überprüft. Des Weiteren wurden die Gene *bssCAB*, welche für die (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase in *G. metallireducens* kodieren, in einen Expressionsvektor kloniert. Die Anzuchten von *T. aromatica* bzw. *Azoarcus* sp. Stamm T und Präparation derer Extrakte wurden nach einem optimierten Verfahren durchgeführt, das bei beiden Stämmen die Messung der vollen Enzymaktivität der (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase erlaubte (K. Verfürth, 2005).

2.1 Charakterisierung der rekombinanten (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase

2.1.1 Überproduktion und Reinigung

Die (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase wurde wie in Material und Methoden 6.1 beschrieben unter aeroben Bedingungen in *E. coli* BL21(DE3) überproduziert. Alle folgenden Schritte, wie die Zellernte, die Präparation von Zellextrakten und Reinigung des rekombinanten Enzyms, wurden unter anaeroben Bedingungen durchgeführt (Material und Methoden 4.3, 4.4 und 6.2.4). Analog zur Zellernte und Präparation von Zellextrakten von auf Toluol gewachsenen Zellen von *T. aromatica* (siehe Ergebnisse 2.3.1) wurden die geernteten Zellen mit überproduzierter (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase nicht eingefroren, sondern sofort Zellextrakte präpariert. Das Enzym wurde anschließend über Affinitätschromatographie an Strep-Tactin-

Superflow gereinigt (Abb. 40), wobei aus 1 g Feuchtmasse 1 mg reine (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase erhalten wurde. Die Ausbeuten waren vergleichbar mit dem bisherigen Verfahren von C. Feil (2006).

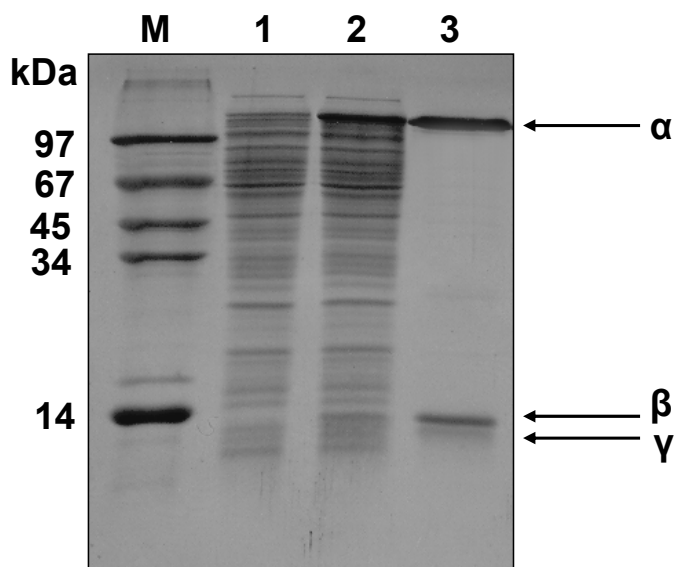


Abb. 40: SDS-Reinigungsgel der rekombinanten Strep-getagten (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase. Gezeigt ist die Reinigung der (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase über Strep-Tactin-Superflow. Ganze Zellen von *E. coli* BL21(DE3) mit pBSS-Strep vor und nach Induktion mit 1mM IPTG, sowie das Eluat nach Affinitätschromatographie an Strep-Tactin-Superflow wurden über ein 15%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Der obere Pfeil markiert die Bande der überproduzierten 98 kDa großen α -Untereinheit, der mittlere und untere jeweils die der β - bzw. γ -Untereinheit (8,5 kDa bzw. 6,4 kDa). Die Färbung erfolgte mit Coomassie-Blau. **M:** Molekularmassenstandard, **1:** Ganze Zellen von *E. coli* vor Induktion mit 1 mM IPTG, **2:** Ganze Zellen von *E. coli* nach Induktion mit 1 mM IPTG, **3:** Eluat nach Chromatographie an Strep-Tactin-Superflow.

2.1.2 Aktivierungsversuche der rekombinanten (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase

Wird die (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase nach Überproduktion in *E. coli* über SDS-PAGE aufgetrennt, so erscheint die α -Untereinheit des Enzyms immer als einzelne Bande (siehe Abb. 40, Spur 3). Dies weist darauf hin, dass das Enzym nach der Überproduktion in *E. coli* im nicht-aktivierten Zustand vorliegt. Um aktiv zu werden, muss es erst durch das aktivierende Enzym in einen Radikal-haltigen Zustand versetzt werden (Leuthner et al., 1998). Dies war bisher nicht möglich, weil das aktivierende Enzym in Zellextrakten von *T. aromatica* eine zu geringe Aktivität hat (Leuthner et al., 1998) und das rekombinante Enzym nur in Form von inaktiven Einschlusskörperchen erhalten wurde (K. Hermuth, 2002; B. Leuthner, 1999). Erst als Fusionsprotein mit His-Tag und Thioredoxin wurde das

aktivierende Enzym in *E. coli* zu maximal 3 % in der löslichen Fraktion überproduziert (J. Hogg, 2008; C. Feil, 2006).

C. Feil zeigte in ihrer Dissertation (2006) erstmals Enzymaktivität rekombinanter (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase nach *in vitro*-Aktivierung mit Zellextrakten mit überproduziertem aktivierendem Enzym als Fusionsprotein. Dabei wurde das Reaktionsprodukt aktivierter (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase, (*R*)-Benzylsuccinat, über RP-HPLC nachgewiesen. In den Ansätzen des Aktivierungstestes befanden sich die Substrate Toluol und Fumarat sowie *S*-Adenosylmethionin als Radikalinitiator. Zur Reduktion der [Fe-S]-Cluster des aktivierenden Enzyms wurden die Reduktionsmittel Titancitrat und Natriumdithionit eingesetzt. Die gemessene spezifische Aktivität des aktivierten Enzyms lag bei $0,2 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$ (C. Feil, 2006). Die im Vergleich zu (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase-Aktivitäten in Zellextrakten von *T. aromatica* sehr niedrige Enzymaktivität legt nahe, dass ein oder mehrere Kofaktoren zusätzlich benötigt werden. Die Menge an aktivierter (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase war daher vermutlich auch zu gering, um eine oxygenolytische Spaltung des aktivierten Enzyms über Western-Blot-Analyse nachzuweisen (C. Feil, 2006). Dazu wurden oben beschriebenen Aktivierungsansätze an Luft inkubiert und anschließend über Western-Blot mit Antikörpern gegen den Strep-Tag analysiert. Nach Abspaltung eines 4 kDa großen Fragmentes am C-Terminus einer der α -Untereinheiten der (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase ($\alpha_2\beta_2\gamma_2$) sollte dabei nach einer Auftrennung des Proteins eine Doppelbande zu erkennen sein: eine Bande bei 98 kDa (ungespaltene α -Untereinheit) und eine Bande bei 94 kDa (aktivierte α -Untereinheit).

In dieser Arbeit wurden Untersuchungen zur Aktivierbarkeit gereinigter (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase in Anlehnung an die Experimente von C. Feil (2006) durch Nachweis des Produktes aktivierter (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase über RP-HPLC und Nachweis der oxygenolytischen Spaltung über Western-Blot-Analyse durchgeführt (Material und Methoden 6.7.6). Um eventuell fehlende Kofaktoren zu ergänzen, wurden dabei zusätzlich Rohextrakte von *T. aromatica* bzw. *Azoarcus* sp. Stamm T eingesetzt, deren (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase-Aktivitäten zuvor durch Inkubation an Luft inaktiviert worden waren (Material und Methoden 6.7.6). Die rekombinante (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase konnte in den Western-Blot-Analysen durch die Detektion des Strep-Tags von dem nativen Enzym unterschieden werden. Da bisher noch keine Reinigungsprozedur für das aktivierende Enzym etabliert ist, wurden des Weiteren Zellextrakte mit überproduziertem aktivierendem Enzym in den Aktivierungsversuchen

eingesetzt, in denen das Fusionsprotein bis zu 10 % in der löslichen Fraktion vorlag (siehe Ergebnisse 2.4.1).

Die Bildung des Produktes aktivierter (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase wurde in keinem der Reaktionsansätze über RP-HPLC-Analyse detektiert, womit die Ergebnisse von C. Feil (2006) in dieser Arbeit nicht reproduziert werden konnten (Daten nicht gezeigt). Auch nach Western-Blot-Analysen mit Antikörpern gegen den Strep-Tag wurde in den Reaktionsansätzen mit Zellextrakten von *T. aromatica* bzw. *Azoarcus* sp. Stamm T und Zellextrakten mit aktivierendem Enzym keine Doppelbande beobachtet: alle Banden liegen auf gleicher Höhe wie unbehandelte (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase (Abb. 41, Spuren 1-3). Da auch in Ansätzen mit nicht-inaktiviertem Zellextrakt von *T. aromatica* und Zellextrakten mit überproduziertem aktivierendem Enzym keine Doppelbande detektiert wurde (Abb. 41, Spur 4), lassen die erhaltenen Ergebnisse vermuten, dass zur Aktivierung rekombinanter (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase weitere Supplemente benötigt werden.

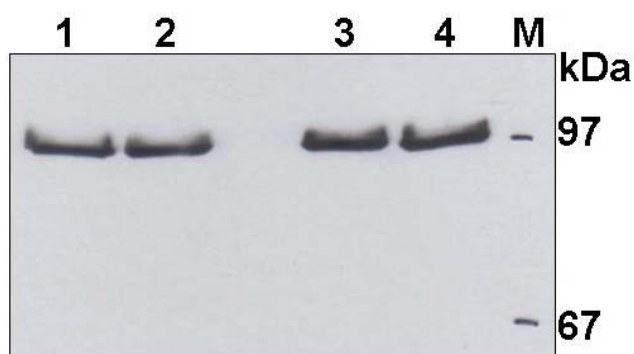


Abb. 41: Western-Blot-Analyse zum Nachweis der Aktivierung rekombinanter (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase. Die Abbildung zeigt den Immunoblot eines 7%igen SDS-Polyacrylamidgels mit Antikörpern gegen den Strep-Tag. Aufgetragen wurden gleiche Mengen der Aktivierungsansätze, die nach Ende der Reaktionszeit für 10 Minuten an Luft inkubiert wurden. **M:** Molekularmassenstandard; **1:** unbehandelte (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase. **2:** Aktivierungsansatz mit Zellextrakt von *T. aromatica* und Zellextrakt mit überproduziertem aktivierendem Enzym nach 15 Minuten Reaktionszeit. **3:** Aktivierungsansatz mit Extrakt von *Azoarcus* sp. Stamm T und Zellextrakten mit aktivierendem Enzym nach 15 Minuten Reaktionszeit. **4:** Aktivierungsansatz mit nicht-inaktiviertem Zellextrakt von *T. aromatica* und Zellextrakt mit überproduziertem aktivierendem Enzym nach 15 Minuten Reaktionszeit.

2.2 Klonierung der (R)-Benzylsuccinat-Synthase aus *Geobacter metallireducens*

Die rekombinante (R)-Benzylsuccinat-Synthase wurde bereits kristallisiert, jedoch reichte die erhaltene Auflösung nicht zur Aufklärung der Struktur aus (C. Feil, 2006). Daher wurden die Gene *bssCAB*, welche für die drei Untereinheiten des orthologen Enzyms in *G. metallireducens* kodieren, in den Expressionsvektor pCR-Script Amp SK(+) unter Kontrolle eines IPTG-induzierbaren T7-Promotors kloniert (Material und Methoden 5.10). Zugleich wurde dabei am N-Terminus der α -Untereinheit (BssA) ein Strep-Tag anfusioniert, indem die Klonierung in zwei Schritten mit jeweils passend konstruierten Primern für PCR-Amplifikationen durchgeführt wurde (Abb. 42, A). Dabei wurde die Strep-Tag-kodierende Sequenz direkt hinter das Startkodon von *G. metallireducens* von *bbsA* eingebaut (Abb. 42, B), während sonst keine Sequenzänderungen der Gene von *G. metallireducens* vorgenommen wurden. Das erhaltene Plasmid pCR-Script-*GeobssCAB* wurde durch Kontrollrestriktionen mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen und DNA-Sequenzanalysen (siehe Anhang 3.1) überprüft.

Überproduktion des Fusionsproteins in *E. coli*. Versuche zur Überproduktion des Fusionsproteins wurden wie in Material und Methoden 6.1 beschrieben in *E. coli* BL21(DE3) bzw. *E. coli* Rosetta(DE3) durchgeführt. Die erwarteten Molekülmassen der Untereinheiten des Enzyms betrugen ca. 98 kDa für die α -Untereinheit mit anfusioniertem Strep-Tag, 9 kDa für die β -Untereinheit und 7 kDa für die γ -Untereinheit. Unter diesen Bedingungen wurde jedoch keine Überproduktion beobachtet (Daten nicht gezeigt). Auch bei veränderten Überproduktionsbedingungen (Material und Methoden 6.1) wurde das Enzym in *E. coli* nicht produziert (Daten nicht gezeigt). Neuere Klonierungsversuche zeigten kürzlich, dass nach Austausch der ribosomalen Bindestelle vor *bssC* die (R)-Benzylsuccinat-Synthase in *E. coli* überproduziert wird (persönliche Mitteilung M. Hilberg).

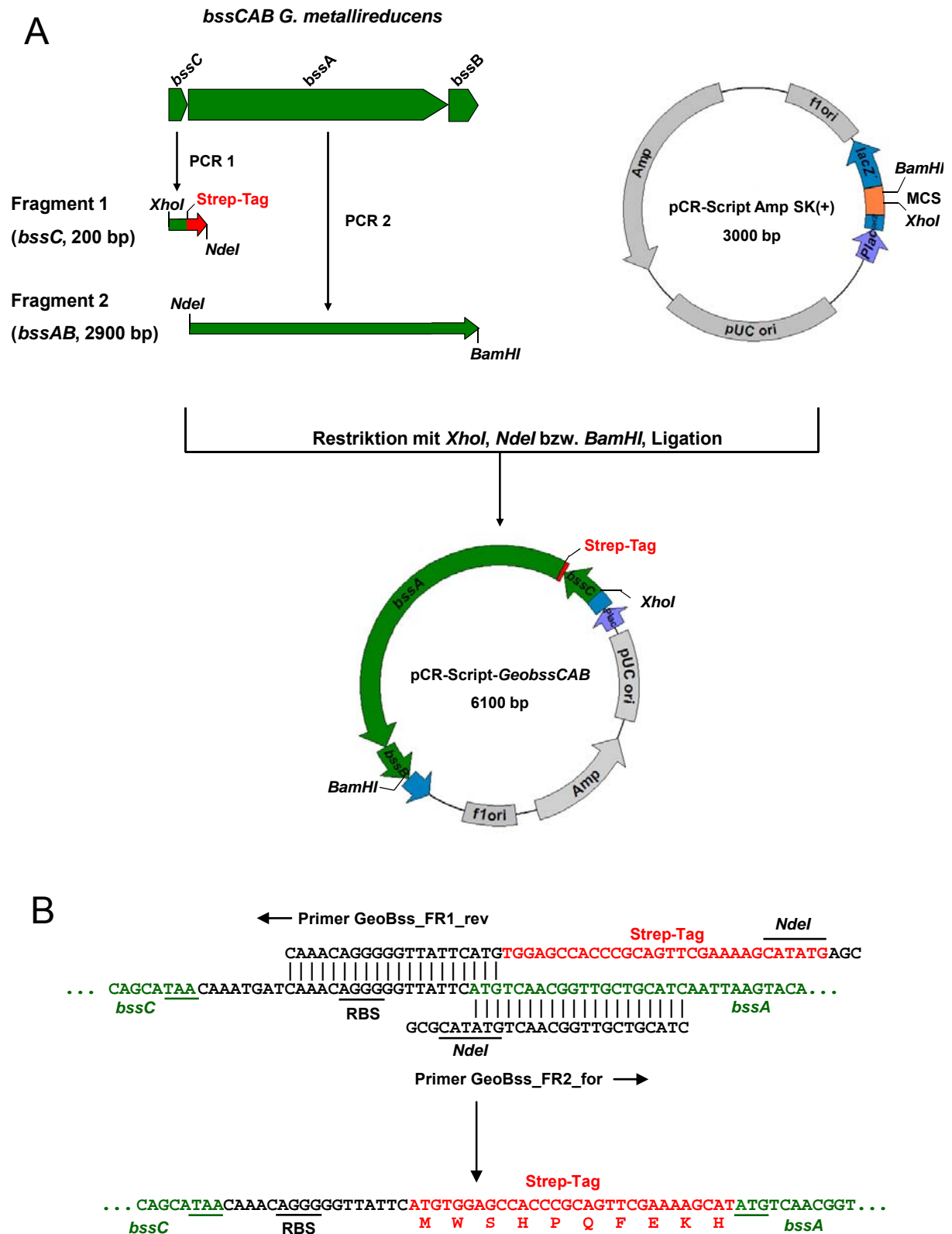


Abb. 42: Klonierung der Gene *bssCAB* aus *G. metallireducens* in den Expressionsvektor pCR-Script Amp SK(+). **A:** Die Klonierung wurde in 2 Schritten durchgeführt, um eine Strep-Tag-kodierende Sequenz in das Konstrukt einzuführen. Die PCR-Fragmente wurden mit den Restriktionsendonukleasen *XhoI* und *NdeI* (Fragment 1) bzw. *NdeI* und *BamHI* (Fragment 2) hydrolysiert und in den mit *XhoI* und *BamHI* geschnittenen Vektor pCR-Script Amp SK(+) ligiert. **B:** Über den Primer GeoBss_FR1_rev wurde hinter das Startkodon von *bssA* die Sequenz für einen Strep-Tag in das PCR-Fragment 1 eingebaut. Fragment 1 und 2 wurden über die in beide Primer eingefügte Restriktionsschnittstelle für *NdeI* ligiert.

2.3 Die (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase aus *T. aromatica* und *Azoarcus* sp. Stamm T

Ein schwerwiegendes Problem bei der Untersuchung der (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase war bislang die geringe Aktivität in Rohextrakten (C. Leutwein, 2002). Des Weiteren zeigt die rekombinante (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase keine Aktivität (siehe Ergebnisse 2.1.2). In Rohextrakten von *T. aromatica* wurden anfangs nur spezifische Aktivitäten von maximal $0,2 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$ gemessen, die etwa 1% des theoretisch notwendigen Wertes entsprechen (C. Leutwein, 2002). K. Verfürth erhielt in seiner Dissertation (2005) eine 120-fach gesteigerte Enzymaktivität von $24 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$ durch verbesserte Anzucht- und Erntebedingungen, die in dieser Arbeit für *T. aromatica* bzw. *Azoarcus* sp. Stamm T reproduziert werden sollten.

2.3.1 Zellanzucht und Herstellung von Zellextrakten

T. aromatica bzw. *Azoarcus* sp. Stamm T wurden unter anaeroben, denitrifizierenden Bedingungen auf Toluol bzw. Benzoat als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle kultiviert und ab einer $\text{OD}_{578\text{nm}} > 2,0$ unter anaeroben Bedingungen geerntet (Material und Methoden 4.2 und 4.3). Nach Ernte der Zellen wurden sofort Rohextrakte präpariert (Material und Methoden 4.4), da nach Einfrieren ganzer Zellen Aktivitätsverlust beobachtet wurde (Verfürth et al., 2004).

In Abb. 43 ist ein SDS-Polyacrylamidgel mit Zellextrakten von *T. aromatica* und *Azoarcus* sp. Stamm T gezeigt. In der Kontrollspur (Abb. 43, Spur 1) wurde gereinigte rekombinante (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase in der nicht-aktivierten Form aufgetragen. Nach Aktivierung der (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase trägt eine der großen Untereinheiten ein Glycylradikal, an dem die Peptidkette oxygenolytisch gespalten wird. Dies führt zum Auftreten einer charakteristischen Doppelbande, die bei den Extrakten von *T. aromatica* Stamm K172 und *Azoarcus* sp. Stamm T nach Anzucht mit Toluol zu erkennen ist (Abb. 43, Spur 2 und 4). In Benzoat-abbauenden Kulturen von *T. aromatica* und *Azoarcus* sp. Stamm T ist die (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase nicht induziert und die entsprechenden Doppelbanden fehlen (Abb. 43, Spur 3 und 5). Die abweichende Größe des Kontrollproteins erklärt sich durch den zusätzlich vorhandenen Strep-Tag.

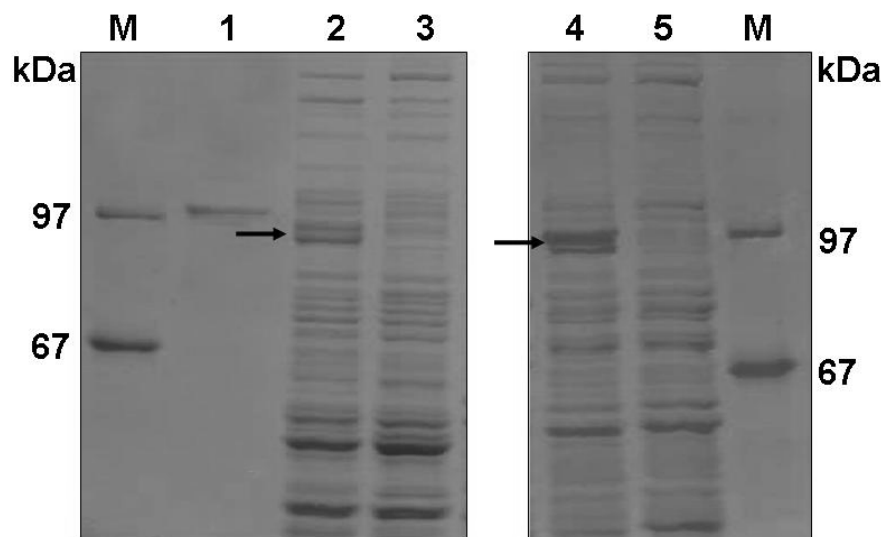


Abb. 43: Zellextrakte von *T. aromatica* und *Azoarcus* sp. Stamm T nach Anzucht auf Toluol bzw. Benzoat. Zellextrakte von *T. aromatica* und *Azoarcus* sp. Stamm T wurden über ein 8%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Färbung erfolgte mit Coomassie-Blau. **M:** Molekularmassenstandard. **1:** Gereinigte rekombinante (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase in der nicht-aktivierten Form, wo nur eine Bande im Bereich von 98 kDa zu beobachten ist. **2:** Zellextrakt von auf Toluol gewachsenen Zellen von *T. aromatica*. **3:** Zellextrakt von auf Benzoat gewachsenen Zellen von *T. aromatica*. **4:** Zellextrakt von auf Toluol gewachsenen Zellen von *Azoarcus* sp. Stamm T. **5:** Zellextrakt von auf Benzoat gewachsenen Zellen von *Azoarcus* sp. Stamm T.

2.3.2 Produktnachweis über RP-HPLC

Die Aktivitäten der nativen (*R*)-Benzylsuccinat-Synthasen in Zellextrakten von auf Toluol kultivierten Zellen von *T. aromatica* bzw. *Azoarcus* sp. Stamm T wurden in einem diskontinuierlichen Enzymtest bestimmt, wobei die Bildung des Produktes (*R*)-Benzylsuccinat über RP-HPLC detektiert wurde (Material und Methoden 6.7.7).

In Reaktionsansätzen mit Rohextrakten von *T. aromatica* wurde nach 10 Minuten Reaktionszeit bei gleichzeitiger Abnahme der Produkte Fumarat und Toluol ein Produkt detektiert, das nach etwa 6 Minuten eluierte (Abb. 44, A und B). Im UV/Vis-Spektrum zeigt das Produkt ein für (*R*)-Benzylsuccinat charakteristisches Absorptionsmaximum bei 258 nm (Abb. 45). Auch in Reaktionsansätzen mit Zellextrakt von *Azoarcus* sp. Stamm T wurde ein Reaktionsprodukt detektiert, das nach 6 Minuten eluierte (Abb. 45, C) und dessen UV/Vis-Spektrum das für (*R*)-Benzylsuccinat charakteristische Absorptionsmaximum bei 258 nm zeigte (Daten nicht gezeigt). Dieses Produkt wurde in Kontrollansätzen ohne die jeweiligen Zellextrakte und Substrate bzw. in Ansätzen mit Rohextrakten von auf Benzoat gewachsenen Zellen von *T. aromatica* und *Azoarcus* sp. Stamm T nicht beobachtet (siehe Anhang, Tab. 31

A und B). Daher lässt sich die Produktbildung auf die Aktivität der (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase zurückführen. Die Aktivitäten der (*R*)-Benzylsuccinat-Synthasen beider Stämme wurden durch Integration der Peakflächen quantifiziert und lagen für *T. aromatica* bei $18 \pm 2 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$ und für *Azoarcus* sp. Stamm T bei $9 \pm 1,6 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$. Die erhaltenen Daten stimmen gut mit den Untersuchungen von K. Verfürth (2005) überein.

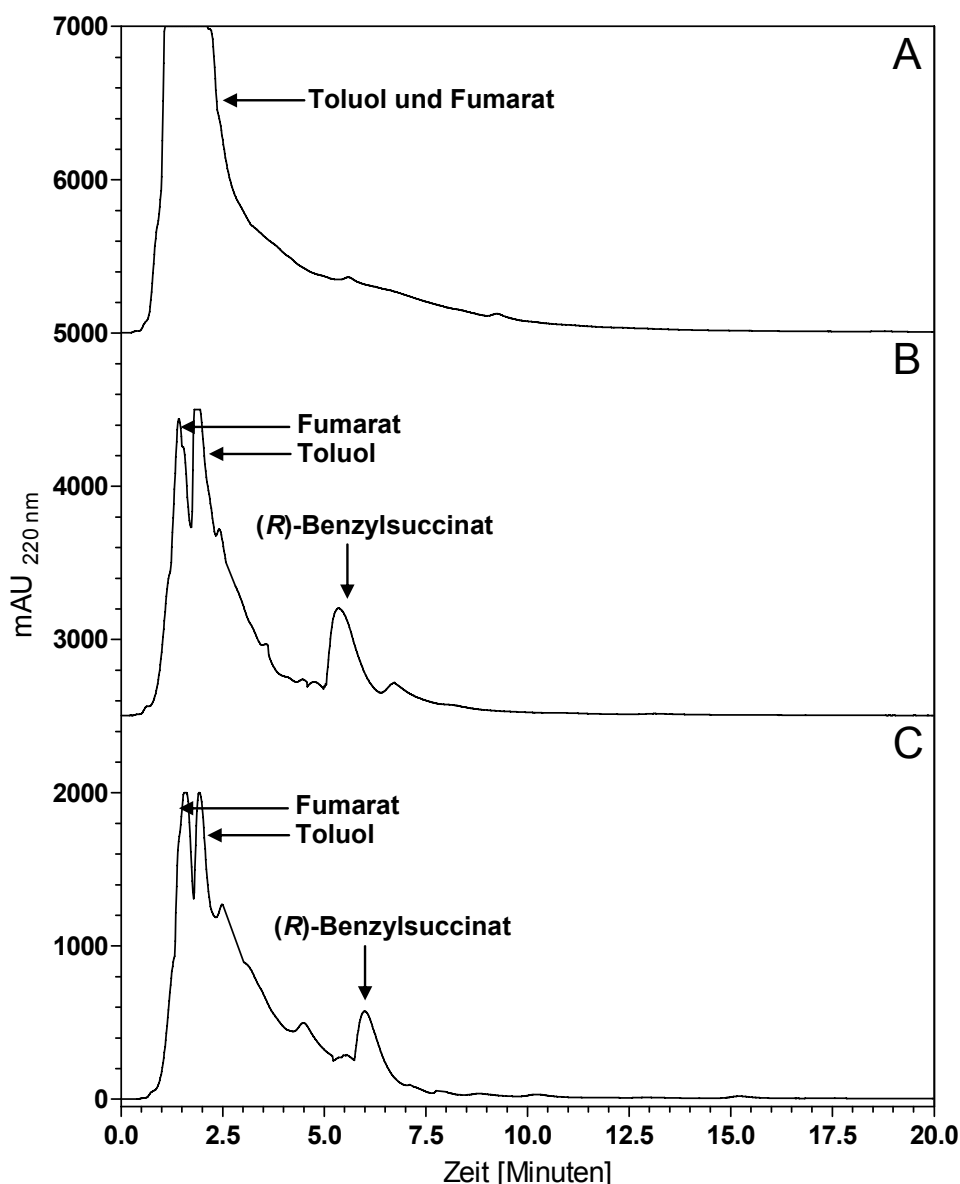


Abb. 44: Produkt-Analyse der Umsetzung von Toluol und Fumarat durch native (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase in Zellextrakten von auf Toluol gewachsenen Zellen von *T. aromatica* und *Azoarcus* sp. Stamm T. Die Reaktionen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten mit Säure gestoppt und nach Entfernen der Proteinfraction wurde der Überstand mittels RP-HPLC unter isokratischen Bedingungen (20 % Acetonitril; 32 mM Formiat, pH 3,0) mit UV-Detektion bei 220 nm analysiert. **A: Reaktion nach 0 Minuten.** Die Substrate Fumarat und Toluol eluierten nach 1 bzw. 2 Minuten. **B und C: Reaktion nach 10 Minuten mit Zellextrakten von *T. aromatica* (B) und Zellextrakten von *Azoarcus* sp. Stamm T (C).** Bei gleichzeitiger Abnahme der Substrate Toluol und Fumarat eluierte nach 6 Minuten (*R*)-Benzylsuccinat. mAU: milli-absorbance unit.

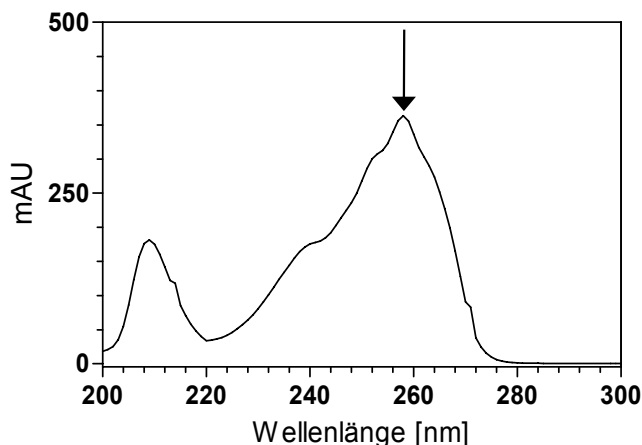


Abb. 45: UV/Vis-Spektrum des in der RP-HPLC-Analyse detektierten Produktes (*R*)-Benzylsuccinat. Das UV/Vis-Spektrum des Produktes der Umsetzung von Toluol und Fumarat durch die (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase in Zellextrakten von *T. aromatica* wurde während des Laufes mit Hilfe eines Dioden-Array-Detektors aufgenommen. Das Produkt zeigt im UV/Vis-Spektrum ein für (*R*)-Benzylsuccinat charakteristisches Absorptionsmaximum bei 258 nm (Pfeil). mAU: milli-absorbance unit.

2.3.3 Substratspektrum der (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase

T. aromatica wächst unter anaeroben Bedingungen auf Toluol als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle, aber auf keinem anderen Kohlenwasserstoff-Substrat (Anders et al., 1995). *Azoarcus* sp. Stamm T nutzt dagegen zwei Kohlenwasserstoffe als Substrate, nämlich Toluol oder *m*-Xylol (Dolfing, 1999; Seyfried, 1994). In früheren Arbeiten wurde gezeigt, dass die (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase in Zellextrakten von auf Toluol gewachsenen Zellen von *T. aromatica* neben Toluol auch die Cresol-Isomere umsetzt (Verfürth et al., 2004). Das Substratspektrum der (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase aus *Azoarcus* sp. Stamm T erwies sich dabei im Vergleich zum Enzym aus *T. aromatica* als umfangreicher, da es neben den Cresolen auch die Xylol-Isomere umsetzt (Verfürth et al., 2004; Beller und Spormann, 1999).

In dieser Arbeit wurde in zellfreien Extrakten von auf Toluol gewachsenen Zellen von *T. aromatica* bzw. *Azoarcus* sp. Stamm T die Umsetzung eines weiteren alternativen Substrates durch die (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase, nämlich *o*-Toluidin (Abb. 46), durch Produktbildung über RP-HPLC untersucht (Material und Methoden 6.7.7).

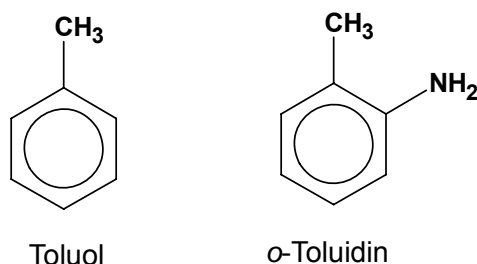


Abb. 46: Strukturformel von *o*-Toluidin als Substrat der (*R*)-Benzylsuccinat-Synthasen aus *T. aromatica* bzw. *Azoarcus* sp. Stamm T. Im Vergleich dazu ist die Strukturformel von Toluol gezeigt.

Nach 15 Minuten Reaktionszeit wurde in Ansätzen mit Zellextrakten von *T. aromatica* bzw. *Azoarcus* sp. Stamm T bei gleichzeitiger Abnahme der Substrate Fumarat und *o*-Toluidin ein Produkt detektiert, das nach 8 Minuten eluierte (Abb. 47, B und C). Das Produkt konnte über HPLC-MS nicht identifiziert werden, jedoch handelt es sich dabei möglicherweise um 2-Aminobenzylsuccinat (siehe Diskussion 2.1). Da dieses Produkt weder in Kontrollansätzen ohne die jeweiligen Zellextrakte und Substrate noch in Ansätzen mit Rohextrakten von auf Benzoat gewachsenen Zellen von *T. aromatica* und *Azoarcus* sp. Stamm T beobachtet wurde (siehe Anhang, Tab. 32 A und B), lässt sich die Produktbildung auf die Aktivität der (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase zurückführen. Die Aktivitäten beider (*R*)-Benzylsuccinat-Synthasen wurden durch Integration der Peakflächen quantifiziert und lagen für *T. aromatica* bei $2,5 \pm 0,4 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$ und für *Azoarcus* sp. Stamm T bei $1,8 \pm 0,2 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$. Zum Vergleich wurden auch die Aktivitäten der Umsetzung von Toluol und der Cresol- bzw. Xylol-Isomere in beiden Zellextrakten ermittelt (Material und Methoden, 6.7.7), die in Tabelle 25 dargestellt sind.

Tab. 25: Spezifische Aktivitäten der (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase in zellfreien Extrakten von auf Toluol gewachsenen Zellen von *T. aromatica* bzw. *Azoarcus* sp. Stamm T mit verschiedenen Substraten. Die spezifischen Aktivitäten sind in $\text{nmol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$ angegeben.

Substrat	<i>T. aromatica</i>	<i>Azoarcus</i> sp. Stamm T
Toluol	18 ± 2	$9 \pm 1,6$
<i>o</i> -Cresol	12 ± 3	$3 \pm 0,5$
<i>m</i> -Cresol	9 ± 1	10 ± 2
<i>p</i> -Cresol	7 ± 2	8 ± 1
<i>o</i> -Xylol	-	$2 \pm 0,6$
<i>m</i> -Xylol	-	2 ± 1
<i>p</i> -Xylol	-	$1,5 \pm 0,2$
<i>o</i> -Toluidin	$2,5 \pm 0,4$	$1,8 \pm 0,2$

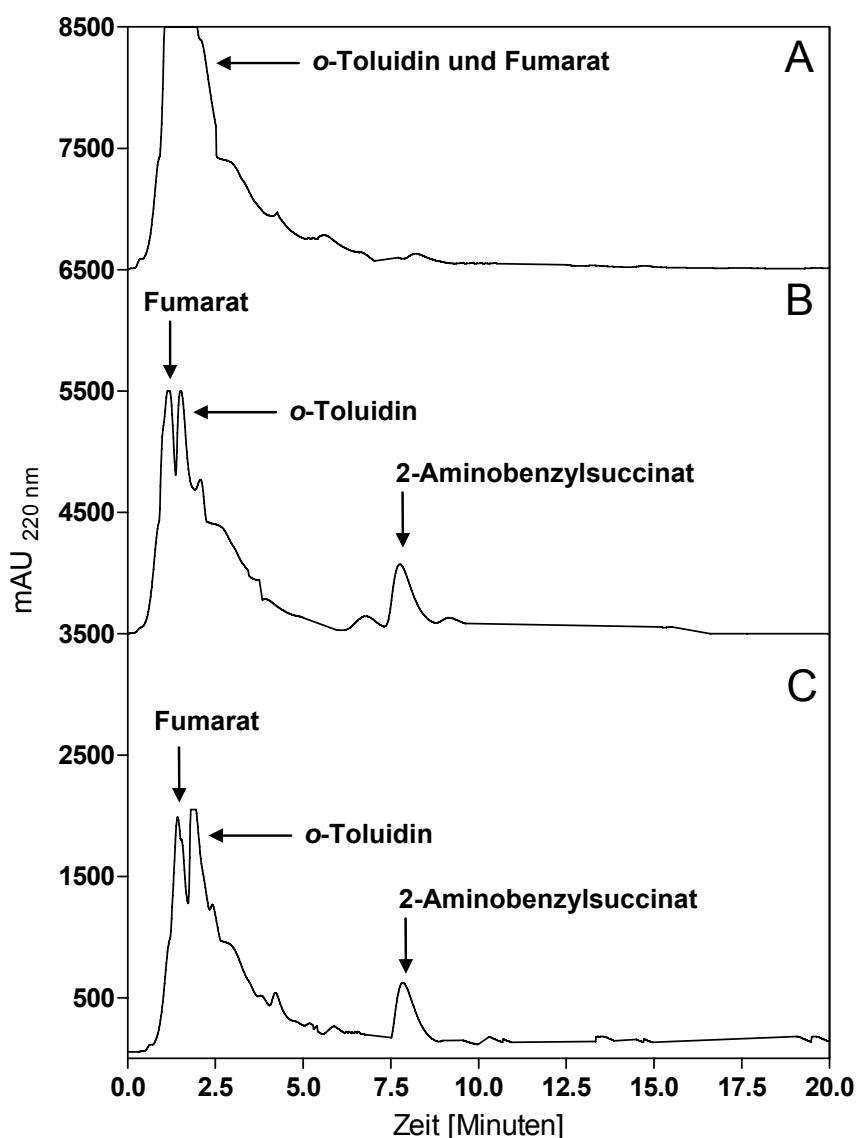


Abb. 47: Produkt-Analyse der Umsetzung von *o*-Toluidin und Fumarat durch native (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase in Zellextrakten von auf Toluol gewachsenen Zellen von *T. aromatica* bzw. *Azoarcus* sp. Stamm T. Die Reaktionen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten mit Säure gestoppt und nach Entfernen der Proteinfraction wurde der Überstand mittels RP-HPLC unter isokratischen Bedingungen (20 % Acetonitril; 32 mM Formiat, pH 3,0) mit UV-Detektion bei 220 nm analysiert. **A: Reaktion nach 0 Minuten.** Die Substrate Fumarat und *o*-Toluidin eluierten nach 1 bzw. 2 Minuten. **B und C: Reaktionen nach 15 Minuten mit Zellextrakt von *T. aromatica* (B) bzw. *Azoarcus* sp. Stamm T (C).** Nach 8 Minuten eluierte bei gleichzeitiger Abnahme der Substrate *o*-Toluidin und Fumarat ein Produkt (2-Aminobenzylsuccinat). mAU: milli-absorbance unit.

2.4 Das aktivierende Enzym

Wie für alle Glycylradikal-Enzyme existiert auch für die (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase ein aktivierendes Enzym, welches für die Einführung des Radikals verantwortlich ist. In *T. aromatica* wird dieses Enzym vom *bssD*-Gen kodiert, welches stromaufwärts der Gene für die drei Untereinheiten der (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase liegt. Das Gen *bssD* wurde bereits in verschiedene Expressionsvektoren kloniert, wobei das überproduzierte Protein jedoch ausschließlich in Form von Einschlusskörperchen vorlag (K. Hermuth, 2002; B. Leuthner, 1999). C. Feil (2006) und J. Hogg (2008) konnten während ihrer Dissertation das *bbsD*-Gen zu etwa 3 % als lösliches Fusionsprotein exprimieren. Das rekombinante Protein besitzt ein N-Terminales Histidin-Patch-Thioredoxin (N-Trx), das durch eine Enterokinase vom synthetisierten Protein entfernt werden kann. Am C-Terminus ist ein immunologisch detektierbares V5-Epitop und daran anschließend ein His-Tag (C-6His) vorhanden. Die Molekülmasse des Fusionsproteins (BssD-N-Trx/C-6His) beträgt etwa 54 kDa (37 kDa BssD; 13,5 kDa N-Terminales Histidin-Patch-Thioredoxin und 3,4 kDa C-Terminales V5-Epitop mit 6His-Tag).

In dieser Arbeit wurde versucht, durch Optimierung der Überproduktionsbedingungen den löslichen Anteil des Fusionsproteins (BssD-N-Trx/C-6His) zu erhöhen, um es biochemisch zu charakterisieren.

2.4.1 Überproduktion des aktivierenden Enzyms in *E. coli* und Herstellung von Zellextrakten

Das Fusionsprotein BssD-N-Trx/C-6His wurde in vorangehenden Arbeiten durch Induktion mit Arabinosekonzentrationen von 0,02 bis 0,002 % in *E. coli* TOP10 bei 37°C überproduziert (J. Hogg, 2008; C. Feil, 2006). Um die Löslichkeit des Proteins zu verbessern wurden in dieser Arbeit die Kulturen nach Induktion mit Arabinose-Konzentrationen von 0,02 bis 0,002 % bei niedrigeren Temperaturen (20°C und 28°C) für weitere 3 Stunden inkubiert. Dabei lag das 53 kDa große Fusionsprotein bei einer Induktor-Konzentration von 0,002 % Arabinose und einer Kultivierungstemperatur von 20°C in der löslichen Fraktion vor und konnte nur über eine Western-Blot-Analyse mit Antikörpern gegen den C-6His-Tag (Material und Methoden 6.6) nachgewiesen werden (Abb. 48, Spur 4). Im Verhältnis zur Intensität der im

Western-Blot detektierten Bande in ganzen Zellen von *E. coli* lag das Fusionsprotein zu etwa 10 % im löslichen Zustand vor.

Die Ernte der Zellen mit überproduziertem Fusionsprotein erfolgte wie in Material und Methoden 4.3 beschrieben unter anaeroben Bedingungen. Die geernteten Zellen wurden nicht eingefroren, sondern direkt Zellextrakte präpariert (Material und Methoden 4.4), die in Ansätzen zur Überprüfung der Aktivierbarkeit rekombinanter (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase eingesetzt wurden (siehe Ergebnisse 2.1.2).

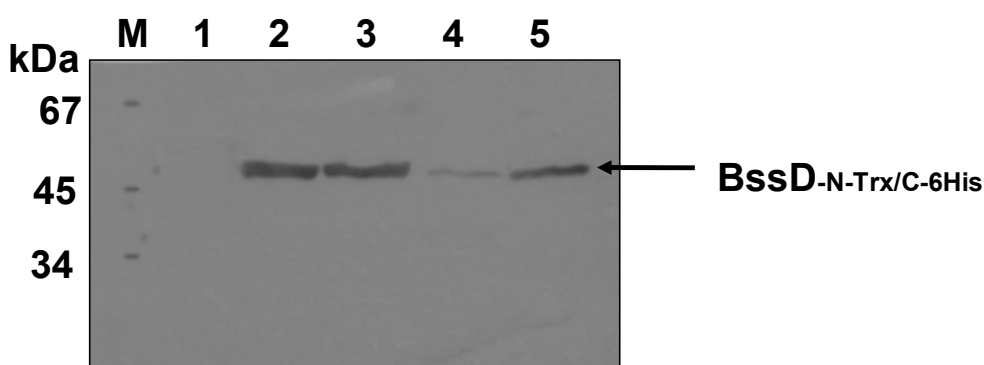


Abb. 48: Western-Blot-Analyse zum Nachweis des rekombinanten aktivierenden Enzyms (BssD-N-Trx/C-6His) in der löslichen und unlöslichen Fraktion des Zellextraktes. Die Abbildung zeigt den Immunoblot eines 15%igen SDS-Polyacrylamidgels mit Antikörpern gegen den C-Terminalen 6His-Tag. Der Pfeil markiert die detektierte Bande des 54 kDa großen Fusionsproteins, das in *E. coli* TOP10 mit pBADTOPO/D102-*bssD* durch Induktion mit 0,002 % Arabinose und Wachstum bei 20°C überproduziert wurde. **M:** Molekularmassenstandard. **1:** Ganze Zellen von *E. coli* vor Induktion. **2:** Ganze Zellen von *E. coli* 2 Stunden nach Induktion mit 0,002 % Arabinose. **3:** Ganze Zellen von *E. coli* 3 Stunden nach Induktion mit 0,002 % Arabinose. **4:** lösliche Fraktion nach Ultrazentrifugation. **5:** unlösliche Fraktion nach Ultrazentrifugation.

2.5 Weitere Genprodukte des *bss*-Operons

Im *bss*-Operon von *T. aromatica* liegen stromabwärts von *bssB* weitere offene Leserahmen (*bssEFG*), deren Produkte bei Wachstum auf Toluol induziert werden (Leuthner und Heider, 1998). Das Gen *bssE* wird gemeinsam mit den *bssDCAB*-Genen kotranskribiert und kodiert für ein 32 kDa großes Protein mit hoher Sequenzähnlichkeit zu ATP-bindenden Proteinen (Neuwald et al., 1999; Leuthner et al., 1998). Das Gen wurde bereits in einen Expressionsvektor kloniert und als unlösliches Fusionsprotein in *E. coli* überproduziert (J. Hogg, 2008). Des Weiteren wurden von J. Hogg (2008) erste Versuche zur Reinigung und Rekonstitution des Fusionsproteins durchgeführt. Stromabwärts des *bssE*-Gens wurden noch zwei weitere Gene identifiziert, nämlich *bssF* und *bssG*. Deren Genprodukte werden in *T. aromatica* durch Wachstum auf Toluol induziert (Kube et al., 2004; K. Hermuth, 2002). Orthologe dieser beiden Gene wurden in den *bss*-Operons einiger anderer Toluolabbauender Stämme gefunden, jedoch konnte diesen beiden Genprodukten bislang keine Funktion zugeordnet werden. Das zu *bssG* orthologe Gen aus *Aromatoleum aromaticum* Stamm EbN1 wurde von J. Hogg in seiner Dissertation (2008) in einen Expressionsvektor kloniert. Bisher wurde das Fusionsprotein aber noch nicht in *E. coli* überproduziert.

In dieser Arbeit wurden BssG und BssE als Fusionsproteine unter verschiedenen Bedingungen in *E. coli* überproduziert und deren Löslichkeit näher untersucht. Des Weiteren wurde das Gen *bssF* aus *T. aromatica* in einen Expressionsvektor kloniert und in *E. coli* überproduziert.

2.5.1 Überproduktion von BssE in *E. coli*

Das Gen *bssE* aus *T. aromatica* wurde bereits von J. Hogg (2008) in den Expressionsvektor pGex6P kloniert. Das Plasmid enthält stromaufwärts des klonierten *bssE*-Gens einen Genabschnitt, der für eine N-Terminal fusionierte Glutathion-S-Transferase (N-GST) kodiert und so eine Reinigung des Fusionsproteins über Affinitätschromatographie an Glutathion-Sepharose ermöglicht. Bei Bedarf kann die Glutathion-S-Transferase durch Behandlung mit einer „PreScission“-Protease vom rekombinanten Protein entfernt werden. Die erwartete Molekülmasse des Fusionsproteins BssE-N-GST beträgt ca. 58 kDa (32 kDa BssE und 26 kDa Glutathion-S-Transferase). Das Fusionsprotein wurde wie in Material und Methoden 6.1

beschrieben in *E. coli* BL21(DE3) bzw. *E. coli* Rosetta(DE3) bei 37°C überproduziert. Unter diesen Bedingungen lag BssE-N-GST jedoch ausschließlich in Form von Einschlusskörperchen vor (Daten nicht gezeigt). Auch Überproduktionsversuche bei niedrigeren Temperaturen und mit variierten Induktorkonzentrationen (Material und Methoden 6.1) zeigten keine verbesserte Löslichkeit des Fusionsproteins (Abb. 49).

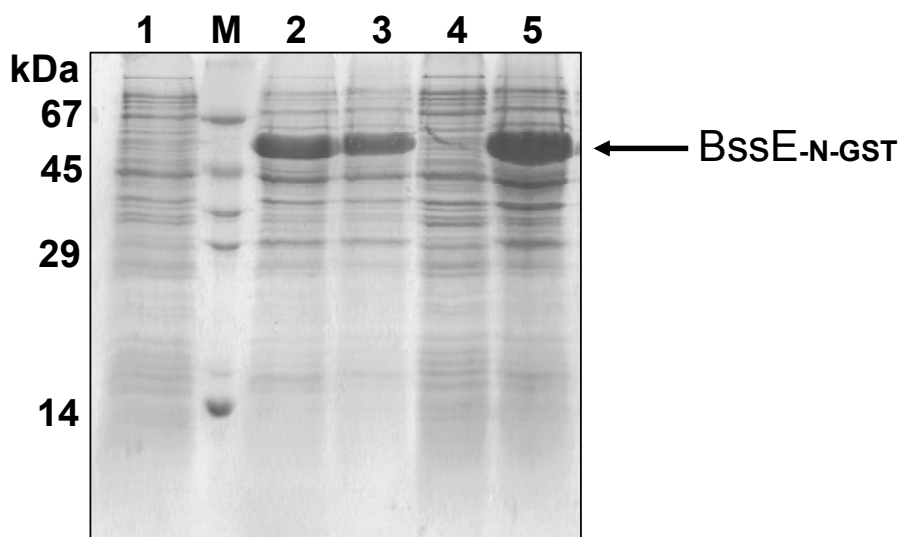


Abb. 49: Überproduktion von BssE-N-GST in *E. coli* BL21(DE3) nach Induktion mit 1 mM IPTG und Wachstum bei 20°C. Gezeigt ist die Überproduktion des 58 kDa großen Fusionsproteins BssE-N-GST in *E. coli*. Der Pfeil markiert die Bande des überproduzierten Proteins. Ganze Zellen von *E. coli* mit pGex6P-*bssE* vor und nach Induktion mit 1mM IPTG, sowie die Proben der löslichen und unlöslichen Fraktionen nach Ultrazentrifugation wurden über ein 15%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Es wurden jeweils 15 µg Protein aufgetragen. Die Färbung erfolgte mit Coomassie-Blau. **M:** Molekularmassenstandard. **1:** Ganze Zellen von *E. coli* vor Induktion mit 1 mM IPTG. **2:** Ganze Zellen von *E. coli* nach 2 Stunden Induktion. **3:** Ganze Zellen von *E. coli* nach 3 Stunden Induktion. **4:** lösliche Fraktion nach Ultrazentrifugation. **5:** unlösliche Fraktion nach Ultrazentrifugation.

2.5.2 Überproduktion von BssG aus *Aromatoleum aromaticum* Stamm EbN1 in *E. coli*

Das Gen *bssG* aus *A. aromaticum* Stamm EbN1 wurde bereits von J. Hogg (2008) in den Vektor pBADTOPO/D-102 kloniert. Das Plasmid enthält stromaufwärts des klonierten *bssG*-Gens die Sequenz des fusionierten N-Terminalen Histidin-Patch-Thioredoxins (N-Trx). Dieses kann bei Bedarf durch Behandlung mit einer Enterokinase vom synthetisierten Protein entfernt werden. Stromabwärts der *bssG*-Sequenz liegen weitere fusionierte Genabschnitte, die für ein immunologisch detektierbares V5-Epitop und daran anschließend einen C-Terminalen His-Tag (C-6His) kodieren. Die erwartete Molekülmasse des Fusionsproteins

(BssG-N-Trx/C-6His) beträgt etwa 38 kDa (21 kDa BssG; 13,5 kDa N-Terminales Histidin-Patch-Thioredoxin und 3,4 kDa C-terminales V5-Epitop mit 6His-Tag). Versuche zur Überproduktion des Fusionsproteins wurden wie in Material und Methoden 6.1 beschrieben in *E. coli* TOP10 bei 37°C durchgeführt. Es lag jedoch ausschließlich in Form von Einschlusskörperchen vor (Abb. 50). Auch durch Änderung verschiedener Parameter während der Überproduktion (Material und Methoden 6.1) wurde die Löslichkeit des Fusionsproteins nicht verbessert (Daten nicht gezeigt).

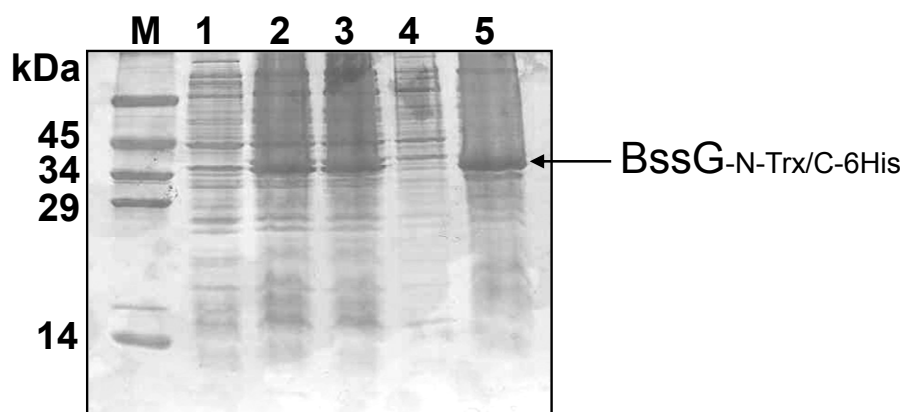


Abb. 50: Überproduktion von BssG-N-Trx/C-6His in *E. coli* TOP10 nach Induktion mit 1 mM IPTG und Wachstum bei 37°C. Gezeigt ist die Überproduktion des 38 kDa großen Fusionsproteins BssG-N-Trx/C-6His in *E. coli* TOP10. Der Pfeil markiert die Bande des überproduzierten Proteins. Ganze Zellen von *E. coli* TOP10 mit pBADTOPO/D102-*bssG* vor und nach Induktion mit 1mM IPTG, sowie die Proben der löslichen und unlöslichen Fraktionen nach Ultrazentrifugation wurden über ein 15%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Es wurden jeweils 20 µg Protein aufgetragen. Die Färbung erfolgte mit Coomassie-Blau. **M:** Molekularmassenstandard. **1:** Ganze Zellen von *E. coli* vor Induktion mit 1 mM IPTG. **2:** Ganze Zellen von *E. coli* 1 Stunde nach Induktion mit 1 mM IPTG. **3:** Ganze Zellen von *E. coli* 3 Stunden nach Induktion mit 1 mM IPTG. **4:** lösliche Fraktion nach Ultrazentrifugation. **5:** unlösliche Fraktion nach Ultrazentrifugation.

2.5.3 Klonierung von *bssF* aus *T. aromatica*

Die Klonierung des Gens *bssF* aus *T. aromatica* in den Vektor pJOE2775 unter Kontrolle eines L-Rhamnose-induzierbaren Promotors erfolgte wie in Material und Methoden 5.10 beschrieben. Das erhaltene Konstrukt pJOE2775-*bssF* wurde durch Kontrollrestriktionen mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen und DNA-Sequenzanalysen überprüft (siehe Anhang 3.2). Stromabwärts des klonierten *bssF*-Gens enthält das Plasmid eine Sequenz, die für einen C-Terminales Histidin-Tag (C-6His) kodiert (Abb. 51). Die Fusion des Gens *bssF* mit sechs Histidincodons, die vor dem Translationsstop-Signal in dem Vektor liegen, ermöglicht eine Aufreinigung des Proteins mittels Affinitätschromatographie. Die erwartete

Molekülmasse des Fusionsproteins liegt bei etwa 64 kDa. Das Fusionsprotein BssF-C-6His wurde wie in Material und Methoden 6.1 beschrieben in *E. coli* DH5α bei 37°C überproduziert (Abb. 52, Spur 2 und 3). Weitere Untersuchungen zur Löslichkeit des Proteins wurden in dieser Arbeit jedoch nicht mehr durchgeführt.

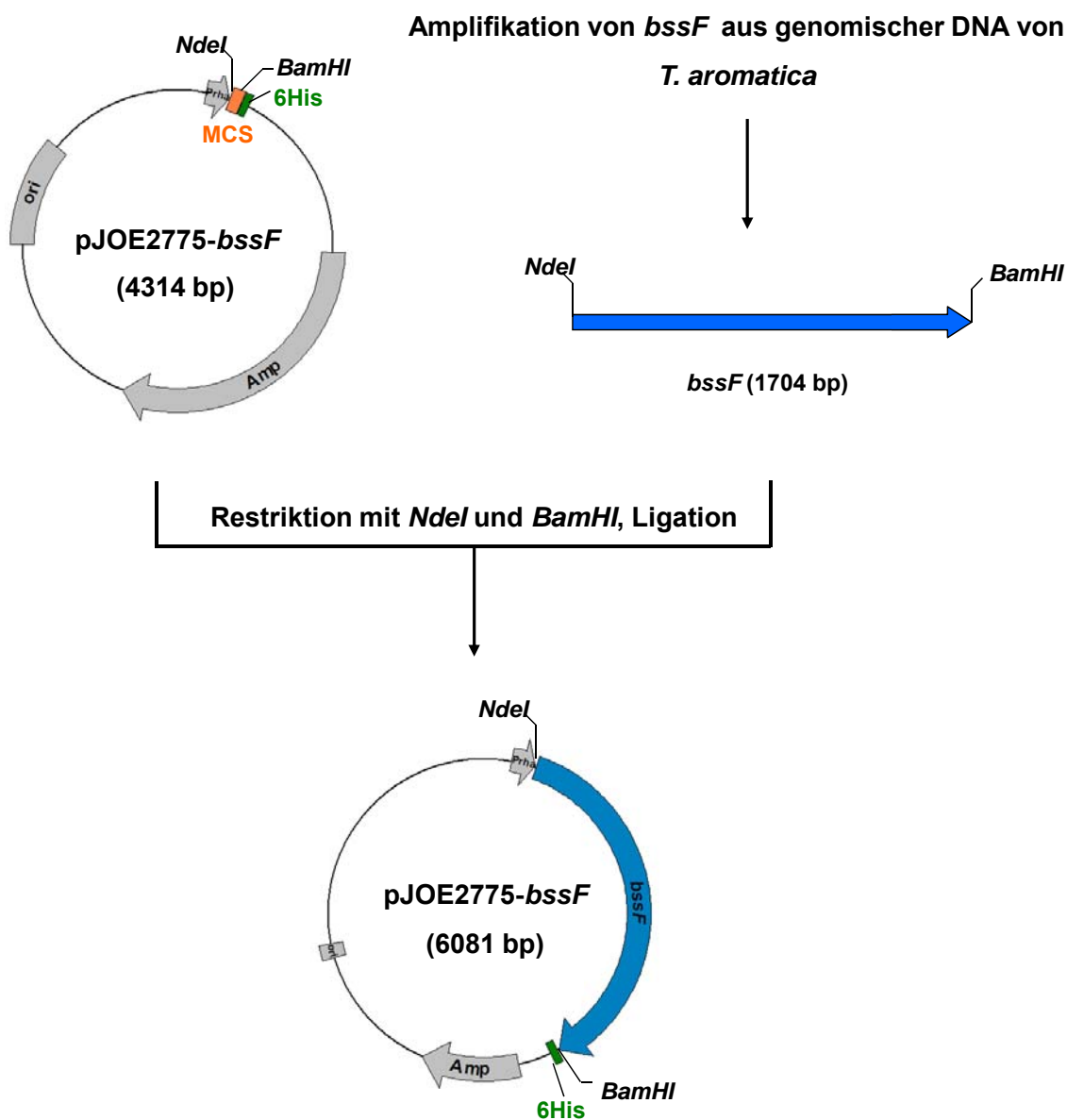


Abb. 51: Strategie zur Klonierung von *bssF* in den Expressionsvektor pJOE2775. Das Gen *bssF* wurde über PCR aus genomischer DNA von *T. aromatica* amplifiziert. Die Erkennungssequenzen für die Restriktionsendonukleasen *NdeI* und *BamHI* wurden über die Primer eingefügt, so dass das Fragment nach der Restriktion in den ebenso geschnittenen Expressionsvektor pJOE2775 ligiert werden konnte. Das entstandene Konstrukt enthält Stromabwärts des klonierten *bssF*-Gens eine durch das Plasmid kodierte Sequenz, die für einen C-Terminalen Histidin-Tag (6His) kodiert

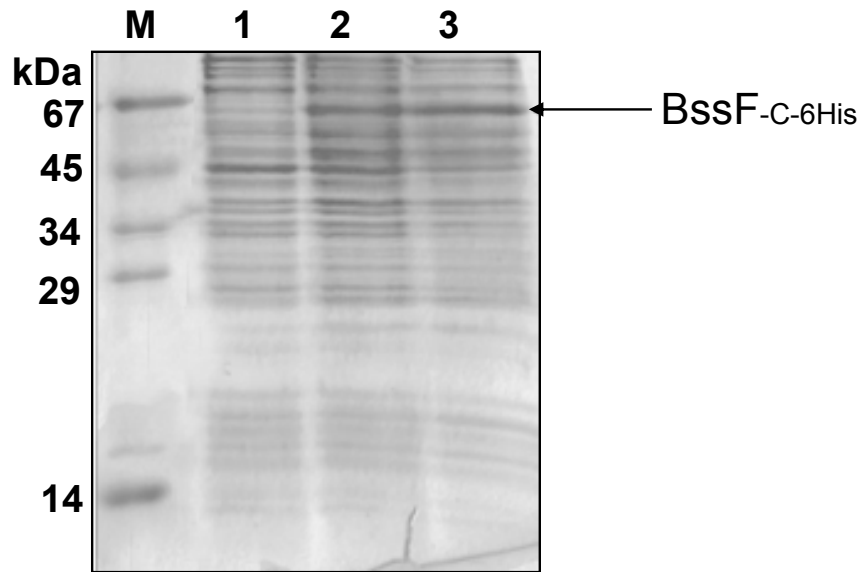


Abb. 52: Überproduktion von BssF-C-6His in *E. coli* BL21(DE3) nach Induktion mit 0,2 % Rhamnose und Wachstum bei 37°C. Ganze Zellen von *E. coli* DH5α mit pJOE2775-*bssF* vor und nach Induktion mit 0,2 % L-Rhamnose, sowie die Proben der löslichen und unlöslichen Fraktionen nach Ultrazentrifugation wurden über ein 15%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Es wurden jeweils 15 µg Protein aufgetragen. Der Pfeil markiert die Bande des überproduzierten 64 kDa großen Fusionsproteins. Die Färbung erfolgte mit Coomassie-Blau. **M:** Molekularmassenstandard. **1:** Ganze Zellen von *E. coli* vor Induktion. **2:** Ganze Zellen von *E. coli* 1 Stunde nach Induktion. **3:** Ganze Zellen von *E. coli* 2 Stunden nach Induktion.

V. Diskussion

1. Enzyme der β -Oxidation von (*R*)-Benzylsuccinat

Der anaerobe Abbau von Toluol durch *T. aromatica* beginnt mit der Addition der Methylgruppe von Toluol an die Doppelbindung des Kosubstrates Fumarat. Diese Reaktion katalysiert das Glycylradikalenzym (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase, das durch ein aktivierendes Enzym posttranslational aktiviert wird (Leuthner et al., 1998). Es wird postuliert, dass das Produkt (*R*)-Benzylsuccinat anschließend analog zur bekannten β -Oxidation von Fettsäuren zu Benzoyl-CoA, dem zentralen Intermediat des anaeroben Aromatenstoffwechsels, und Succinyl-CoA oxidiert wird. Die ersten beiden Enzyme, die an der Aktivierung des (*R*)-Benzylsuccinats zum CoA-Thioester und der anschließenden Oxidation zu (*E*)-Phenylitaconyl-CoA beteiligt sind, eine Succinyl-CoA-(*R*)-Benzylsuccinat CoA-Transferase und eine (*R*)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase, wurden bereits biochemisch untersucht (Leutwein und Heider, 2001; Leutwein und Heider, 1999). Zudem zeigte C. Feil in ihrer Dissertation (2006), dass das Genprodukt von *bbsH* eine (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase ist, die große Sequenzähnlichkeiten zu anderen Enoyl-CoA-Hydratasen aufweist. Zu Beginn der Arbeit waren die Enzyme, die das entstandene Intermediat 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA weiter zu Benzoyl-CoA und Succinyl-CoA umsetzen, nicht charakterisiert.

Daher wurden in dieser Arbeit die Enzyme biochemisch charakterisiert, welche die Umsetzung von (*E*)-Phenylitaconyl-CoA zu Benzoyl-CoA und Succinyl-CoA katalysieren, nämlich die (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase (BbsH), die 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA Dehydrogenase (BbsCD) und die Benzoylsuccinyl-CoA Thiolase (BbsAB).

1.1 Die (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase

Im Toluol-induzierten *bbs*-Operon wurde ein Gen (*bbsH*) gefunden, dessen Produkt ähnlich zu den Enzymen ist, die bei der β -Oxidation von Fettsäuren analoge Hydratisierungs-Reaktionen katalysieren (Leuthner und Heider, 1999). Deswegen wurde vermutet, dass *bbsH* für die geforderte (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase kodiert (Leuthner und Heider, 2000). Daher wurde die (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase in dieser Arbeit heterolog in *E. coli* überproduziert, gereinigt und charakterisiert. Die biochemischen Eigenschaften des Enzyms

sind in Tabelle 26 aufgeführt.

Tab. 26: Eigenschaften der (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase (Ergebnisse 1.1 und 1.2).

Eigenschaften	
Substrate	(<i>E</i>)-Phenylitaconyl-CoA
Produkt	2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA
Komposition	α_4 (28 kDa/Untereinheit)
Kofaktoren	keine
pH-Optimum	pH 6,2 - pH 6,3
Alternatives Substrat	(<i>E</i>)-Phenylitaconyl- <i>N</i> -Acetylcysteamin
spezifische Aktivität PiCoA^1	$27 \pm 4 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$
spezifische Aktivität PNAC^2	$26 \pm 2 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$
apparenter $K_m \text{PiCoA}$ -Wert ¹	$109 \pm 7 \mu\text{M}$
apparenter $K_m \text{PNAC}$ -Wert ²	$101 \pm 3 \mu\text{M}$
$V_{\max} \text{PiCoA}^1$	$32 \pm 3 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$
$V_{\max} \text{PNAC}^2$	$31 \pm 1,4 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$
$K_{is} \text{PiCoA}^1$	$234 \pm 1,4 \mu\text{mol}$
$K_{is} \text{PNAC}^2$	$226 \pm 9 \mu\text{mol}$

¹ PiCoA: (*E*)-Phenylitaconyl-CoA

² PNAC: (*E*)-Phenylitaconyl-*N*-Acetylcysteamin

Die gemessene spezifische Aktivität der Homotetrameren (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase, die in dieser Arbeit erstmals mit reinem 4-(*E*)-Phenylitaconyl-CoA bestimmt werden konnte, lag bei $27 \pm 4 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$. Sie liegt damit in einem ähnlichen Bereich wie die spezifische Aktivität der Cyclohexa-1,5-Dien-1-Carbonyl-CoA Hydratase aus *T. aromatica*, die am weiterführenden Benzoyl-CoA-Abbau beteiligt ist (Laempe et al., 1998). Eine besondere Schwierigkeit bei den Arbeiten zur (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase war, dass das Substrat (*E*)-Phenylitaconyl-CoA bereits bei pH-Werten um den Neutralpunkt sehr schnell hydrolysierte, so dass keine Enzymaktivität mehr gemessen werden konnte (C. Feil, 2006). Die Messungen wurden daher zuerst bei pH-Werten von pH 5,8 bis pH 7,5 durchgeführt und das ermittelte pH-Optimum bei pH 6,2 bis pH 6,3 könnte durch einen Messartefakt beeinflusst sein. Da die freie Säure nach Hydrolyse des CoA-Thioesters vom Enzym nicht mehr als Substrat akzeptiert wird, kann diese Frage auch nicht durch Verwendung alternativer Enzymassays gelöst werden. Das alternative Substrat (*E*)-

Phenylitaconyl-*N*-Acetylcysteamin zeigte identisches Hydrolyseverhalten wie (*E*)-Phenylitaconyl-CoA.

Die Reaktion der (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase folgt einer sigmoidalen steady-state-Kinetik bei Substratkonzentrationen $< 200 \mu\text{M}$. Bei höheren Konzentrationen von (*E*)-Phenylitaconyl-CoA wurde eine Substratinhibition beobachtet; die Reaktionsgeschwindigkeit war bei einer Substratkonzentration von $500 \mu\text{M}$ bereits um etwa 20 % reduziert. Um die Substrathemmung des kooperativen Enzyms mathematisch zu analysieren, wurde eine Kurvenanpassung gegen eine modifizierte Hill-Gleichung durchgeführt. In Analogie zur Gleichung für unkompetitive Inhibition bei nicht-kooperativen Enzymen (Gleichung 5; Cornish-Bowden, 2004) wurde dazu ein Inhibitions-Term in die Hill-Gleichung eingeführt (Gleichung 6, Höffken et al. 2006). Der Inhibitions-Term in Gleichung 5 zeigt an, dass jeweils ein Substrat in der aktiven (hoch-affinen) Stelle und ein weiteres an einer allosterisch-regulatorischen (nieder-affinen) Stelle binden kann. Dagegen wird in Gleichung 6 berücksichtigt, dass die Anzahl der Substrate im aktiven Zentrum bzw. an allosterischen Stellen kooperativer Enzyme kein ganzzahliger Wert sein muss. Der Hill-Koeffizient N steht dabei für die durchschnittliche Zahl der Substrate im aktiven Zentrum, während der Exponent M für die durchschnittliche Zahl der zusätzlich gebundenen Substrate an der allosterischen Stelle steht. Durch Potenzierung der Inhibitionskonstante K_{is} mit dem Koeffizienten M wird erreicht, dass der erhaltene Wert analog zum K_{is} -Wert der konventionellen Inhibitions-gleichung wird. Die Regressionskurve der Datensätze mit nicht festgelegten Para-

$$v = \frac{V_{\max} \cdot [x]}{K_m + [x] + \frac{[x]^2}{K_{is}}}$$

Gleichung 5: Inhibitions-Gleichung für nicht-kompetitive Hemmung von nicht kooperativen Enzymen nach Cornish-Bowden (2004). V_{\max} : maximale Geschwindigkeit, K_m : Michaelis-Konstante, x : Substratkonzentration, K_{is} : Substratinhibitions-Konstante.

$$v = \frac{V_{\max} \cdot [x]^N}{K_m + [x]^N + \frac{[x]^{N+M}}{K_{is}^M}}$$

Gleichung 6: Modifizierte Inhibitions-Gleichung für nicht-kompetitive Hemmung von kooperativen Enzymen (Höffken et al., 2006). V_{\max} : maximale Geschwindigkeit, K_m : Michaelis-Konstante, x : Substratkonzentration, K_{is} : Substratinhibitions-Konstante, N : durchschnittliche Zahl der Substrate im aktiven Zentrum (Hill-Koeffizient), M : durchschnittliche Zahl der zusätzlichen Substrate an der allosterischen Stelle des Enzyms.

metern ergab einen Hill-Koeffizienten N von 4, einen apparenten K_m -Wert von $109 \pm 7 \mu\text{M}$ und ein V_{max} von $32 \pm 3 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$. Für Wasser, das zweite Substrat der (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase, lässt sich kein K_m -Wert ermitteln, da es im Überschuss vorliegt. Der Datenfit korrelierte gut mit den experimentell erhaltenen Daten (R^2 : 0,976). Des Weiteren wurde für den Exponenten M ein Wert von 0,83 und für die Substratinhibitions-Konstante K_{is} ein Wert von $234 \pm 12 \mu\text{M}$ berechnet. Die erhaltenen Daten zeigen, dass jedes der vier aktiven Zentren im Enzymkomplex ein Substrat gebunden hat ($N=4$) und ein Substrat an die allosterische Seite des Komplexes ($M=0,83$) gebunden hat. Die Umsetzung des alternativen Substrates (*E*)-Phenylitaconyl-*N*-Acetylcysteamin folgte ebenfalls einer sigmoidalen steady-state-Kinetik mit Substratinhibition. Daher wurde auch hier eine Kurvenanpassung gegen die modifizierte Inhibitions-Gleichung (Gleichung 6) durchgeführt. Dabei wurde ein Hill-Koeffizient von $N=4$, ein apparenter K_m -Wert von $101 \pm 3 \mu\text{M}$, ein V_{max} von $31 \pm 1,4 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$, eine Substratinhibitionskonstante von K_{is} zu $226 \pm 9 \mu\text{M}$ und für M ein Wert von 0,76 ermittelt (R^2 : 0,983). Die erhaltenen Daten sind vergleichbar mit denen aus der Umsetzung des natürlichen Substrates (*E*)-Phenylitaconyl-CoA. In Zukunft kann also das wesentlich billiger herzustellende (*E*)-Phenylitaconyl-*N*-Acetylcysteamin anstelle des CoA-Thioesters für weitere Versuche eingesetzt werden.

Die (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase gehört zur Familie der Enoyl-CoA Hydratasen und enthält neben dem für diese Familie charakteristischen Sequenzmotiv auch zwei konservierte Glutamat-Reste und einen Glycin-Rest im aktiven Zentrum (C. Feil, 2006; Leuthner und Heider, 1999). Enoyl-CoA Hydratasen katalysieren die Hydratisierung von 2-*trans*-Enoyl-CoA- zu 3-Hydroxyacyl-CoA-Thioestern, wobei das Produkt immer in (*S*)-Konformation vorliegt (He und Yang, 1997). Das Produkt der (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase wurde über RP-HPLC nachgewiesen, wobei die Retentionszeiten und das Spektrum der Verbindung gut mit früheren Daten übereinstimmen (C. Feil, 2006). Durch HPLC-MS-Analysen wurde bestätigt, dass es sich dabei um 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA handelt, das zwei chirale C-Atome enthält (C. Feil, 2006). Mit den bisherigen Untersuchungen war es allerdings nicht möglich, die Stereochemie des Produktes zu bestimmen, da es für weitere chemische Analysen nicht in ausreichender Menge vorlag. Aufgrund der Ähnlichkeit der (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase zu anderen Enoyl-CoA Hydratasen ist anzunehmen, dass die Hydratisierung über den gleichen Reaktionsmechanismus abläuft, den Studien an gut untersuchten Enoyl-CoA Hydratasen aus *E. coli* nahe legen (Hofstein et al., 1999; He und Yang, 1997). Im ersten Schritt könnte demzufolge ein protoniertes Glutamat im aktiven

Zentrum der (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase ein Proton an das α -C-Atom von (*E*)-Phenylitaconyl-CoA übertragen (Abb. 53, 1). Gleichzeitig entzieht das zweite, deprotonierte Glutamat des aktiven Zentrums einem Wassermolekül ein Proton, wobei das entstehende Hydroxylion das β -C-Atom des Substrates nukleophil angreift (Abb. 53, 1). Ein konservierter Glycinrest der Polypeptidkette stabilisiert dabei den Übergangszustand, wodurch die für eine Produktbildung nötigen elektronischen Umlagerungen begünstigt werden (Abb. 53, 2). Der letzte Schritt der Hydratisierung besteht in der Freisetzung des Produktes (Abb. 53, 3). Die Hydratisierung durch die (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase folgt damit einer *syn*- β -Additions- bzw. Eliminationsreaktion, wobei die beiden konservierten Glutamatreste des aktiven Zentrums durch ihre Funktion als Säure bzw. Base eine große Rolle spielen. Das Produkt der Reaktion müsste demnach in einer (*S*)-(*S*)-Konformation vorliegen, was z. B. durch massenspektroskopische Untersuchungen mit Fragmentierungsanalysen weiter aufgeklärt werden kann.

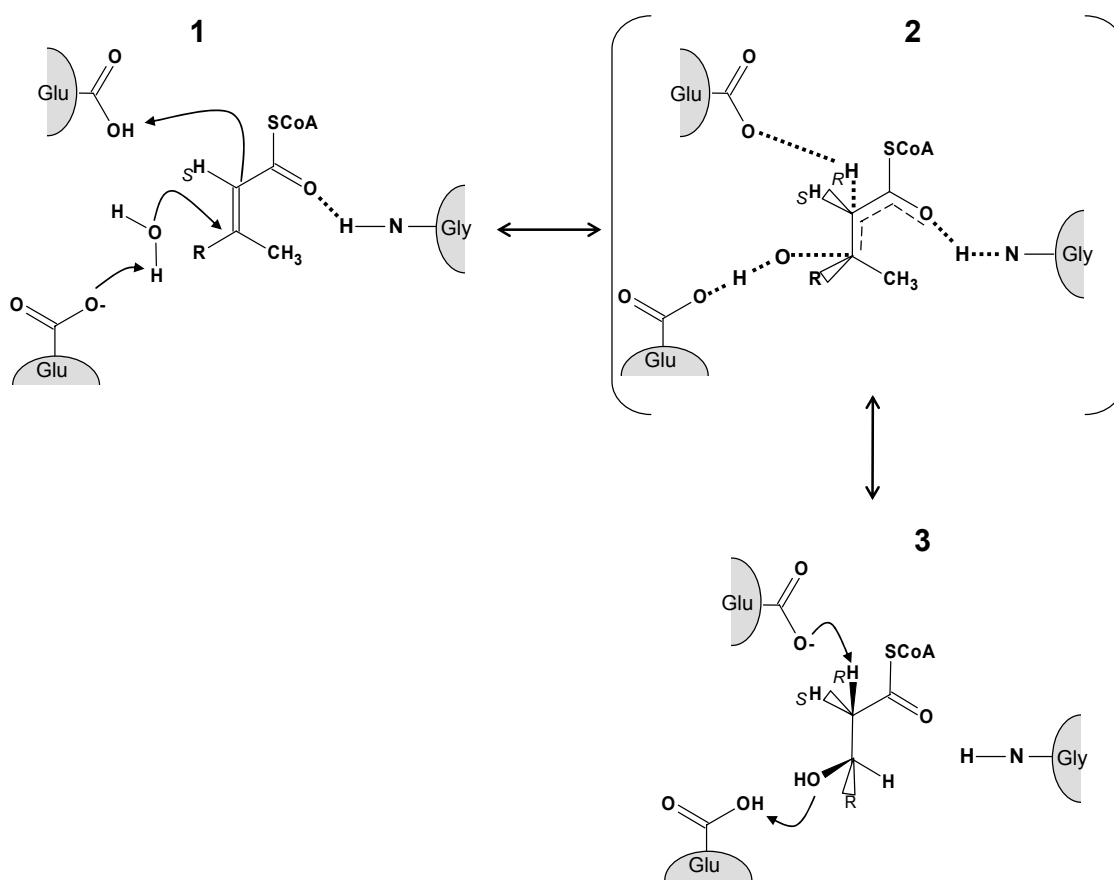


Abb. 53: Reaktionsmechanismus der Hydratisierung durch Enoyl-CoA Hydratasen (nach He und Yang, 1997). **1:** Übertragung eines Protons von einem protonierten Glutamat auf das α -C-Atom des Substrates 2-*trans*-Enoyl-CoA. Gleichzeitig attackiert ein anderes deprotoniertes Glutamat ein Proton eines Wassermoleküls, dessen Sauerstoffatom das β -C-Atom des Substrates nukleophil angreift. **2:** Der Übergangszustand wird durch einen Glycinrest des Polypeptidrückgrats stabilisiert. **3:** Das gebildete 3-Hydroxyacyl-CoA verlässt das aktive Zentrum. R: Methylgruppe oder ungeradzahlige Alkylgruppe.

1.2 Die 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA Dehydrogenase

Im Toluolinduzierbaren *bbs*-Operon sind zwei Gene (*bbsCD*) enthalten, die möglicherweise für die geforderte 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA Dehydrogenase des β -Oxidationsweges von Benzoylsuccinyl-CoA kodieren (Leuthner und Heider, 2000). Die Produkte der beiden Gene sind zu 34 % identisch und haben jeweils große Ähnlichkeit zu den Untereinheiten kurzkettiger Alkohol-Dehydrogenasen, zu denen typischerweise die 3-Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenasen anderer β -Oxidationswege bzw. β -Kondensationswege gehören (Leuthner und Heider, 2000). Die größten Ähnlichkeiten bestehen jeweils mit 3-Oxoacyl-ACP-Reduktasen der Fettsäure-Synthese von *Pseudomonas aeruginosa* (Acc.-Nummer: O54438) bzw. *Thermotoga maritima* (Acc.-Nummer: AAD36790).

Alkohol-Dehydrogenasen sind in Pro- und Eukaryonten weit verbreitet und katalysieren die Oxidation von primären Alkoholen zu Aldehyden bzw. von sekundären Alkoholen zu Ketonen, sowie die Reduktion von Aldehyden oder Ketonen zu den entsprechenden Alkoholen. In Abhängigkeit der dabei verwendeten Kofaktoren werden diese in drei Gruppen eingeteilt (Reid und Fewson, 1994): (i) Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD)- oder Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADP)-abhängige Alkohol-Dehydrogenasen. (ii) Alkohol-Dehydrogenasen die Kofaktoren wie z.B. Pyrollochinolinchinon (PQQ) oder F420 verwenden. (iii) Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD)-abhängige Alkohol-Dehydrogenasen. Aufgrund zahlreicher struktureller und funktioneller Gemeinsamkeiten werden NAD(P)-abhängige Alkohol-Dehydrogenasen in eine Superfamilie eingeteilt, zu der drei Klassen gehören (Jörnvall et al., 1987). Mitglieder der kurzkettigen (short-chain) Alkohol-Dehydrogenasen sind meist multimere Enzyme, die aus etwa 250 Aminosäuren aufgebaut sind. Der bekannteste Vertreter dieser Familie ist die Alkohol-Dehydrogenase aus *Drosophila*, deren Struktur aufgeklärt werden konnte (Smilda et al., 2001). Die mittelkettigen Alkohol-Dehydrogenasen (bis 350 Aminosäuren) werden zur zweiten Klasse eingeteilt und enthalten Zinkionen, die für katalytische Eigenschaften und zur Stabilisierung der Proteinstruktur zuständig sind. Basierend auf Sequenz- und Funktionsähnlichkeiten wurde diese zweite Klasse als eigene Superfamilie (medium-chain Dehydrogenase/Reduktase) definiert (Riveros-Rosas et al., 2003). Die Alkohol Dehydrogenase aus Pferdeleber ist das am besten charakterisierte Enzym dieser Gruppe (Faber, 2000). Alkohol-Dehydrogenasen der dritten Klasse bestehen aus mehr als 350 Aminosäureresten, enthalten Zink oder Eisen und sind biochemisch bisher am wenigsten detailliert untersucht (Riveros-Rosas et al., 2003; Reid

und Fewson, 1994). Enzyme der kurzkettigen Alkohol-Dehydrogenasen enthalten Nahe des N-Terminus eine konservierte NAD(P)-Bindestelle und weiter C-Terminal das konservierte Motiv des katalytischen Zentrums (Lee et al., 1995; Baker, 1994). Auch in den beiden Produkten der Gene *bbsC* und *bbsD* wurden im N-Terminalen Bereich NAD-Bindedomänen gefunden, die auf eine NAD-Abhängigkeit des Enzyms schließen lassen (B. Leuthner, 1999). Dies erklärt auch die beobachtete Steigerung der spezifischen Aktivität der Oxidation von (*E*)-Phenylitaconyl-CoA zu Benzoyl-CoA durch Zugabe von NAD zu Rohextrakten von *T. aromatica* (B. Leutwein, 2000). In dieser Arbeit wurden daher beide Genprodukte in *E. coli* überproduziert, gereinigt und charakterisiert. Die erhaltenen biochemischen Eigenschaften des Enzyms sind in Tabelle 27 dargestellt.

Tab. 27: Eigenschaften der 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA Dehydrogenase (Ergebnisse 1.3 und 1.4).

Eigenschaften	
Substrat	2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA
Produkt	Benzoylsuccinyl-CoA
Komposition	$\alpha\beta$ (BbsC: 26 kDa, BbsD: 28 kDa)
Kofaktoren	keine
pH-Optimum	pH 6,1 - pH 6,2
spezifische Aktivität	$0,86 \pm 0,1 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$
Alternative Substrate (Rückreaktion)	2,2-Dichloracetophenon, 2, <i>p</i> -Dichloracetophenon
apparenter K_m 2-HMPS-CoA -Wert ¹	$84 \pm 8 \mu\text{M}$
apparenter K_m 2,2-DCAP -Wert ²	$241 \pm 11 \mu\text{M}$
apparenter K_m 2, <i>p</i> -DCAP -Wert ³	$306 \pm 21 \mu\text{M}$
V_{max} 2-HMPS-CoA ¹	$1,2 \pm 0,1 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$
V_{max} 2,2-DCAP ²	$4,25 \pm 0,1 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$
V_{max} 2, <i>p</i> -DCAP ³	$10 \pm 1 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$

¹ 2-HMPS-CoA: 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA

² 2,2-DCAP: 2,2-Dichloracetophenon

³ 2,*p*-DCAP: 2,*p*-Dichloracetophenon

Die Aktivität der 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA Dehydrogenase wurde über einen gekoppelten Enzymtest mit dem vorangehenden Enzym des Stoffwechselwegs (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase gemessen, indem die Reduktion von NAD nach Zugabe von

(*E*)-Phenylitaconyl-CoA beobachtet wurde. Das Enzym wurde als Heterodimer aus den Produkten der *bbsCD*-Gene mit einer spezifischen Aktivität von $0,91 \pm 0,1 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$ charakterisiert. Wegen der Hydrolyse-Empfindlichkeit von (*E*)-Phenylitaconyl-CoA bei neutralen pH-Werten ($> \text{pH } 7,0$) war anzunehmen, dass das Produkt der von der (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase katalysierten Reaktion ebenfalls sehr hydrolyseempfindlich ist. Daher wurden die Aktivitäten der 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA Dehydrogenase zuerst bei pH-Werten von pH 5,8 bis 7,0 gemessen. Das pH-Optimum des Enzyms wurde im gekoppelten Enzymtest bei pH 6,1 bis pH 6,2 ermittelt, allerdings kann dies auch von der Aktivität des Hilfsenzyms überlagert sein. Die pH-Optima für die Reduktion alternativer Substrate lagen im ähnlichen Bereich zwischen pH 5,8 und pH 6,3 (A. Wycisk, 2008).

Das Produkt der 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA Dehydrogenase im gekoppelten Enzymtest wurde über RP-HPLC nachgewiesen, konnte aber nicht massenspektroskopisch verifiziert werden. Stattdessen war es jedoch möglich, die Ketogruppe des erwarteten Produktes Benzoylsuccinyl-CoA mit Phenylhydrazin zu einem Hydrazon umzusetzen, das wesentlich später von der RP-HPLC-Säule eluierte. Obwohl auch das Hydrazon über HPLC-MS-Analysen nicht identifiziert werden konnte, bestätigen diese Ergebnisse die Umsetzung zu Benzoylsuccinyl-CoA: (i) Die jeweiligen Produkte der β -Oxidation von (*E*)-Phenylitaconyl-CoA via 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA und der Kondensation von Benzoyl-CoA und Succinyl-CoA wiesen identische Retentionszeiten und Spektren auf. (ii) Beide Produkte werden in Gegenwart von Phenylhydrazin zu einem identischen Hydrazon umgewandelt, was das Vorliegen einer Ketogruppe im Reaktionsprodukt nachweist.

Bekannte Alkohol-Dehydrogenasen liegen normalerweise als Homodimere bzw. Homotetramere vor, wie z. B. die am anaeroben Abbau von Ethylbenzol in *Aromatoleum aromaticum* Stamm EbN1 beteiligte Homodimere (*S*)-1-Phenylethanol-Dehydrogenase (Kniemeyer und Heider, 2001). Der Aufbau der 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA Dehydrogenase als Heterodimer ist deshalb für ein Enzym dieser Familie ungewöhnlich. Bemerkenswerterweise ist beim *bbsC*-Genprodukt zudem ein Tyrosinrest, der im aktiven Zentrum an der Katalyse beteiligt ist, durch einen Valinrest ausgetauscht (B. Leuthner, 1999). Deshalb ist anzunehmen, dass nur die BbsD-Untereinheit des Heterodimers enzymatisch aktiv ist und die BbsC-Untereinheit eventuell nur strukturelle oder regulatorische Funktionen hat.

Die Reaktion der 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA Dehydrogenase folgt einer Kinetik nach Michaelis-Menten. Aus der Kurvenanpassung mit den gemessenen Daten wurde ein apparenter K_m -Wert von $90 \pm 8 \mu\text{M}$ und ein V_{max} von $1,2 \pm 0,1 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$ ermittelt. Von den getesteten Ketonen (reduzierbare Analoga) wurden 2,2-Dichloracetophenon und 2,*p*-Dichloracetophenon von der 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA Dehydrogenase umgesetzt, wohingegen Acetophenon von dem Enzym nicht umgesetzt wurde. Dabei wurde beobachtet, dass die Reduktion der beiden Ketone einem sigmoidalen Kurvenverlauf mit einem Hill-Koeffizienten von $N=4$ für 2,2-Dichloracetophenon bzw. $N=5$ für 2,*p*-Dichloracetophenon folgen. Diese aus den Analysen ermittelten Werte widersprechen allerdings den Ergebnissen der Gelfiltration bzw. nativen Polyacrylamidgelelektrophorese: wenn es sich bei dem Enzym um ein Heterodimer handelt, ist nämlich maximal ein Hill-Koeffizient von $N=2$ möglich. Die experimentellen Daten wurden deshalb separat gegen Hill-Gleichungen (siehe Gleichung 2, Seite 61) mit unterschiedlich festgelegten Hill-Koeffizienten zwischen $N=1$ bis $N=10$ gefittet (Abb. 54, A und B). Eine anschließende Auftragung der Qualitäten der Übereinstimmung der resultierenden Kurven (R^2 -Werte) gegen die entsprechenden Hill-Koeffizienten bestätigte, dass die optimale Übereinstimmung tatsächlich bei einem Hill-Koeffizienten von $N=4$ bzw. $N=5$ liegt (Abb. 54, Inserts in A und B). Eine mögliche Erklärung für diesen scheinbaren Widerspruch wäre, dass die 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA Dehydrogenase in zwei verschiedenen Kompositionen vorliegen könnte: als $\alpha\beta$ -Heterodimer oder $\alpha_2\beta_2$ -Heterotetramer. Das Wechseln eines Enzyms zwischen verschiedenen Untereinheitenzusammensetzungen ist am Beispiel der Glycogen-Phosphorylase gut bekannt (Wang et al., 1989). Dieses Enzym ist am Abbau von Glycogen beteiligt und spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation des Glycogenstoffwechsels (Heinrich und Holzer, 1975). Die inaktive Phosphorylase b-Form des Enzyms ist ein Dimer aus zwei identischen 96 kDa Untereinheiten, das sich zur aktiven tetrameren Phosphorylase a-Form umlagern kann (Leonidas et al., 1992; Wang et al., 1989).

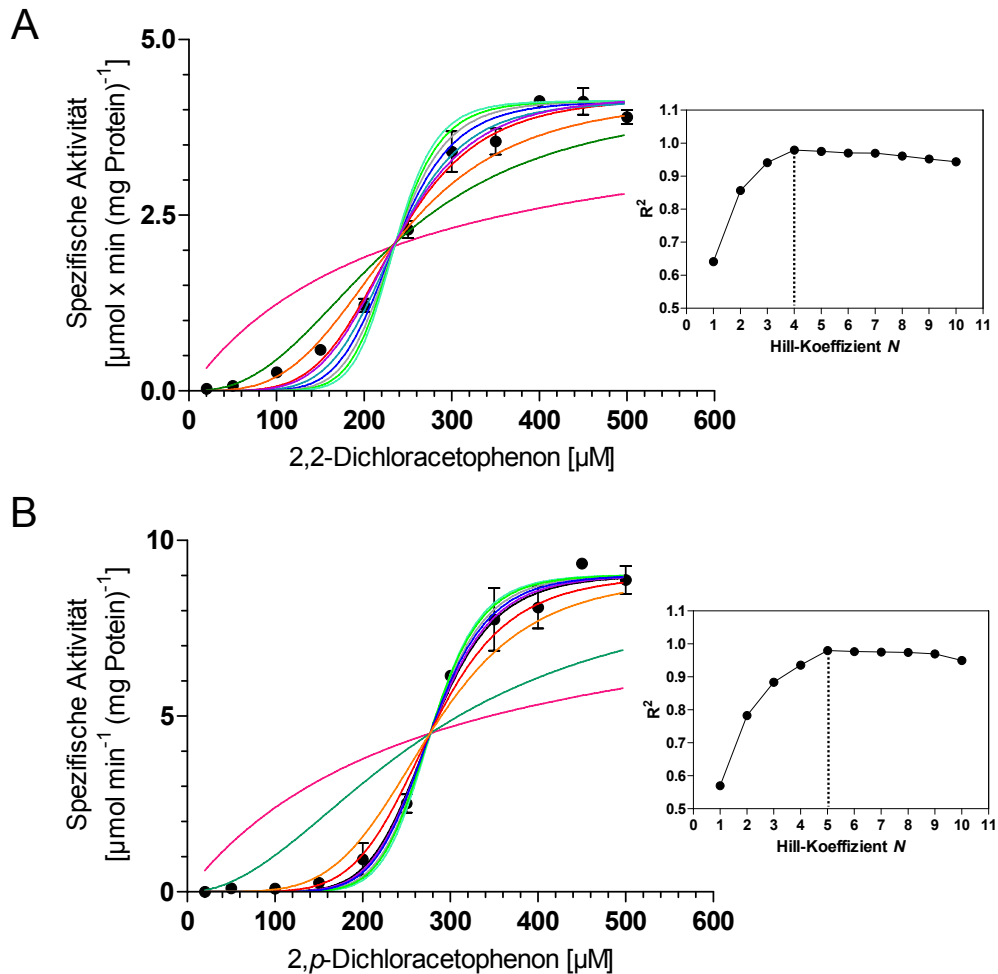


Abb. 54: Regressionskurven der Umsetzung alternativer Substrate durch die 2-Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA Dehydrogenase mit unterschiedlichen Hill-Koeffizienten N . Die experimentellen Meßdaten wurden gegen die Hill-Gleichung mit Hill-Koeffizienten von $N=1$ bis $N=10$ gefittet. Im Insert ist die Auftragung der verwendeten Hill-Koeffizienten ($N=1$ bis 10) gegen die Qualität der Datenfits anhand des statistischen R^2 -Wertes gezeigt. **A: 2,2-Dichloroacetophenon.** Ab einem Hill-Koeffizienten von $N=4$ ist keine signifikante Verbesserung der Kurvenanpassung zu beobachten. **B: 2,p-Dichloroacetophenon.** Ab einem Hill-Koeffizienten von $N=5$ ist keine signifikante Verbesserung der Kurvenanpassung zu beobachten. — $N=1$; — $N=2$; — $N=3$; — $N=4$; — $N=5$; — $N=6$; — $N=7$; — $N=8$; — $N=9$; — $N=10$.

1.3 Die Benzoylsuccinyl-CoA-Thiolase

Im *bbs*-Operon von *T. aromatica* wurde das *bbsB*-Gen gefunden, dessen Produkt hohe Sequenzhomologien zu bakteriellen β -Ketothiolasen zeigt und vermutlich die thiolytische Spaltung von Benzoylsuccinyl-CoA zu Benzoyl-CoA und Succinyl-CoA katalysiert (K. Hermuth, 2002; Leuthner und Heider, 2000; B. Leuthner, 1999; Biegert, 1996). Thiolasen sind in Pro- und Eukaryonten weit verbreitet und werden aufgrund der bevorzugten katalysierten Reaktion und der Substratspezifität in zwei Klassen eingeteilt (Hiltunen und Qin, 2000): (i) Enzyme der Klasse I werden als 3-Ketoacyl-CoA-Thiolasen bezeichnet und

katalysieren die Spaltung von β -Ketoacyl-CoA-Substraten zu Acetyl-CoA und der entsprechend verkürzten β -Ketoacyl-Verbindung. Dies ist der letzte Schritt im oxidativen Abbau von Fettsäuren. Allgemein besitzt diese Enzymklasse eine breite Substratspezifität und setzt Fettsäuren unterschiedlicher Kettenlängen um. Ein gut untersuchtes Enzym dieser Klasse ist die peroxisomale 3-Ketoacyl-CoA-Thiolase aus *Saccharomyces cerevisiae*, dessen Kristallstruktur aufgeklärt werden konnte (Mathieu et al., 1997). (ii) Enzyme der Thiolase-Klasse II, Acetoacetyl-CoA-Thiolasen, katalysieren die Bildung von Acetoacetyl-CoA aus zwei Molekülen Acetyl-CoA bzw. die Rückreaktion (Hiltunen und Qin, 2000; Modis und Wierenga, 2000; Kunau et al., 1995). Im Gegensatz zu den Thiolasen der Klasse I zeigen diese Enzyme eine sehr hohe Substratspezifität und akzeptieren nur Acetoacetyl-CoA bzw. Acetyl-CoA als Substrate (Kunau et al., 1995). Die Acetoacetyl-CoA-Thiolase aus dem Bakterium *Zooglea ramigera* ist ein gut untersuchtes Enzym dieser Klasse, dessen Kristallstruktur aufgeklärt wurde (Modis und Wierenga, 2000; Modis und Wierenga, 1999). Das Protein BbsB zeigt neben Ähnlichkeiten zu bakteriellen β -Ketothiolasen hohe Ähnlichkeiten zur β -Ketothiolasedomäne von nicht-spezifischen Sterol-Carrier-Protein (SPCx) der Ratte (Acc.-Nummer: A39368) und zu einer 3-Ketoacyl-CoA-Thiolase aus *Caenorhabditis elegans* (Acc.-Nummer: NP496639) auf. In diesen Proteinen sind, wie auch in BbsB, im Gegensatz zu allen anderen β -Ketothiolasen nur eines von zwei Cysteinen und zwei von drei Bereichen konserviert (Prosites 00098 und Prosites 00737). Dagegen ist der Bereich um das zweite konservierte Cystein (Prosites 00099), das sich in der Nähe des C-Terminus befindet, nicht vorhanden (K. Hermuth, 2002). Da diese Proteine untereinander sehr ähnlich sind, sich aber von den normalen Thiolasen der Klasse I und II unterscheiden, wurden diese Thiolasen in einer neuen Gruppe zu Typ II-Ketoacyl-CoA-Thiolasen zusammengefasst (Bunyay et al., 2000). Für die Thiolase-Domäne des eukaryontischen Sterol-Carrier-Proteins wurde gezeigt, dass es vorzugsweise die thiolytische Spaltung von verzweigten α -Methyl-3-Oxoacyl-CoA-Substraten katalysiert (Garcia et al., 2000; Antonenkov et al., 1997). Dies stimmt gut mit der erwarteten Spezifität des Thiolase-ähnlichen Proteins BbsB für ein α -Carboxymethyl-verzweigtes Substrat überein.

Zusätzlich wurde auch dem Produkt des zu *bbsB* benachbarten *bbsA*-Gens eine mögliche Rolle bei dieser Reaktion zugeschrieben, dessen Genprodukt nach Wachstum auf Toluol induziert wird (Leuthner und Heider, 2000). Das *bbsA* Gen kodiert für ein hypothetisches Protein unbekannter Funktion mit einer konservierten Sequenzdomäne („DUF35“ für „domain of unknown function“), das in vielen Bakterien und Archaeen vorkommt, teilweise

auch in mehreren Kopien. Signifikanterweise liegen alle bekannten Gene für Proteine der „DUF35“-Familie unmittelbar neben Genen für β -Ketothiolasen, was auf eine funktionelle Beziehung dieser Proteine mit Ketothiolasen schließen lässt. Ein weiterer Hinweis darauf wurde bei ersten Versuchen zur Reinigung der Benzoylsuccinyl-CoA-Thiolase aus *T. aromatica* erhalten, bei denen die Proteine BbsA und BbsB koeluierten (K. Hermuth, 2002).

Aufgrund der vermuteten Rolle von BbsA bei der Reaktion der Benzoylsuccinyl-CoA-Thiolase BbsB wurden beide Untereinheiten zusammen in *E. coli* überproduziert und über zwei Chromatographieschritte gereinigt. Dabei wurden die beiden rekombinanten Proteine voneinander getrennt und separat weiter gereinigt. Die biochemischen Eigenschaften beider Untereinheiten sind in Tabelle 28 zusammengefasst.

Tab. 28: Biochemische Eigenschaften der Benzoylsuccinyl-CoA-Thiolase (Ergebnisse 1.5).

Eigenschaften	
Substrate (Kondensation)	Benzoyl-CoA und Succinyl-CoA
Produkt (Kondensation)	Benzoylsuccinyl-CoA
Komposition	BbsB: α_2
	BbsA: α_2
Kofaktor	1 Zink-Ion/BbsA-Monomer
pH-Optimum	pH 6,2
spezifische Aktivität (Kondensation)	$8 \pm 1 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$
V_{max}	$11 \pm 2 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$
apparenter K_m Benzoyl-CoA-Wert	$155 \pm 12 \mu\text{M}$
apparenter K_m Succinyl-CoA-Wert	$190 \pm 6 \mu\text{M}$

Da das Substrat Benzoylsuccinyl-CoA nicht zur Verfügung stand, wurde die Rückreaktion des Enzyms, nämlich die Kondensation von Benzoyl-CoA und Succinyl-CoA zu Benzoylsuccinyl-CoA, zur Bestimmung der Aktivität herangezogen. Da beide CoA-Thioester Benzoyl-CoA und Succinyl-CoA bei neutralen pH-Werten schnell hydrolysieren (Schachter und Taggart, 1953), wurde die Abhängigkeit der Produktbildung vom pH-Wert untersucht und ein pH-Optimum der Reaktion bei pH 6,2 ermittelt. Überraschenderweise reichte das Thiolase-ähnliche Protein BbsB allein nicht aus, um die Reaktion zu katalysieren, während

aber in Anwesenheit des BbsA-Proteins die Bildung eines Produktes detektiert wurde. Die Identität dieses Produktes mit Benzoylsuccinyl-CoA wurde durch folgende Versuche nahegelegt: (i) Die Produkte der Kondensation von Benzoyl-CoA und Succinyl-CoA und der β -Oxidation von (*E*)-Phenylitaconyl-CoA über 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA wiesen identische Retentionszeiten und Spektren auf. (ii) In Gegenwart von Phenylhydrazin werden beide Produkte zu einem identischen Hydrazon umgewandelt, was das Vorliegen einer Ketogruppe im Reaktionsprodukt nachweist. Die charakteristische Absorption dieses Benzoylsuccinyl-CoA-Hydrazons bei 312 nm wurde zur Entwicklung eines photometrischen Tests für das Enzym ausgenutzt. Dabei wurde die Bildung des Ketons durch die Benzoylsuccinyl-CoA-Thiolase (BbsB und BbsA) über die Zunahme der Absorption bei 312 nm verfolgt. Die so gemessene spezifische Aktivität des gereinigten Enzyms lag bei $8 \pm 1 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$.

Die Rückreaktion der Benzoylsuccinyl-CoA-Thiolase folgt für beide Substrate einer Kinetik nach Michaelis-Menten, das Enzym ist also nicht kooperativ. Der Katalysemechanismus wurde durch die Ermittlung der Enzymkinetiken bei konstanten Konzentrationen von Benzoyl-CoA und variierten Konzentrationen von Succinyl-CoA und umgekehrt aufgeklärt. Dazu wurde zunächst angenommen, dass die Reaktion entweder nach einem Ping-Pong- oder nach einem Ternärkomplex-Mechanismus verläuft. Auf der Grundlage der jeweiligen mathematischen Gleichungen, die diese Mechanismen beschreiben (Gleichung 7 bzw. Gleichung 8), wurden dann die jeweiligen enzymkinetischen Parameter durch mathematische Anpassung der Messdaten ermittelt (Programm Leonora Version 1.0; steady-state Enzyme Kinetics on the IBM® PC and Compatibles; Cornish-Bowden, 1995; Oxford University Press). Aus der Berechnung ergab sich ein K_m Benzoyl-CoA-Wert von $155 \pm 12 \mu\text{M}$, ein K_m Succinyl-CoA-Wert von $190 \pm 6 \mu\text{M}$ und ein V_{max} von $11 \pm 2 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$ für einen angenommenen Ping-Pong-Mechanismus und ein K_m Benzoyl-CoA-Wert von $125 \pm 23 \mu\text{M}$, ein K_m Succinyl-CoA-Wert von $232 \pm 14 \mu\text{M}$ und ein V_{max} -Wert von $13 \pm 3 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$ für einen Ternärkomplex-Mechanismus. Für beide angenommenen Fälle wurden mit den mathematisch ermittelten Parametern schließlich einzelne Kurven berechnet und mit den Messdaten verglichen, indem ihre Übereinstimmung anhand der R^2 -Werte bestimmt wurde. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Abb. 55 in Form von Lineweaver-Burk-Darstellungen gezeigt. Die Parameter zeigten in allen Fällen wesentlich bessere Übereinstimmungen mit Messdaten, wenn von einer Ping-Pong-Kinetik des Enzyms ausgegangen wurde, so dass eine Reaktion nach einem Ternärkomplex-Mechanismus ausgeschlossen werden kann.

$$v = \frac{V_{ab}}{K_{mB}a + K_{mA}b + ab}$$

Gleichung 7: Formel der Zwei-Substrat-Kinetik nach einem Ping-Pong-Mechanismus (Cornish-Bowden, 1995). a : Substratkonzentration a ; b : Substratkonzentration b ; K_{mA} : Michaelis-Konstante für Substrat a , K_{mB} : Michaelis-Konstante für Substrat b , V_{ab} : maximale Geschwindigkeit.

$$v = \frac{V_{ab}}{K_{AB}K_{mB} + K_{mB}a + K_{mA}b + ab} \frac{1}{K_{is}}$$

Gleichung 8: Formel der Zwei-Substrat-Kinetik nach einem Ternärkomplex-Mechanismus (Cornish-Bowden, 1995). a : Substratkonzentration a ; b : Substratkonzentration b ; K_{mA} : Michaelis-Konstante für Substrat a , K_{mB} : Michaelis-Konstante für Substrat b , V_{ab} : maximale Geschwindigkeit; K_{AB} : Limitierende Michaelis-Konstante, K_{is} : Inhibitionskonstante.

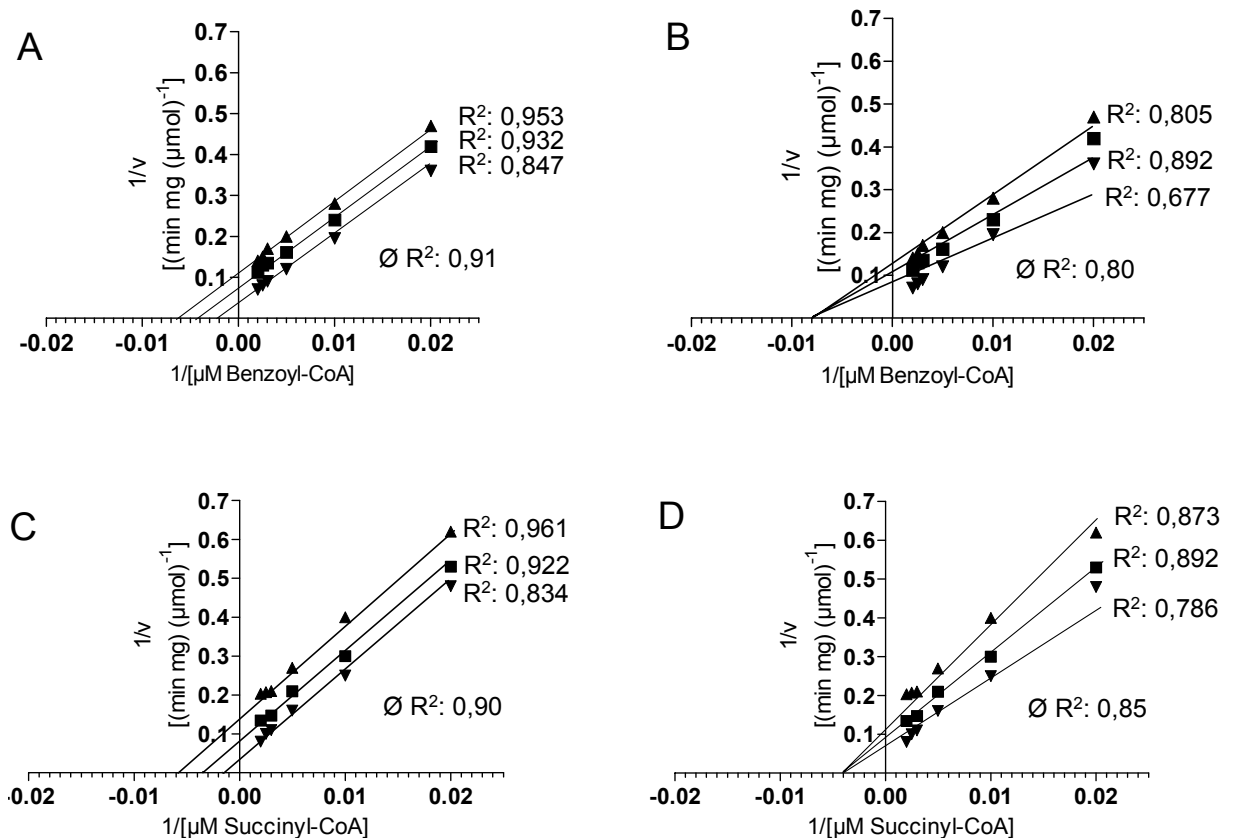


Abb. 55: Doppelt-reziproke Darstellung (Lineweaver-Burk-Plots) der Enzymkinetik der Benzoylsuccinyl-CoA-Thiolase. **A und B:** Experimente mit konstanten Benzoyl-CoA- und variierten Succinyl-CoA-Konzentrationen (\blacktriangle 50 μM , \blacksquare 100 μM , \blacktriangledown 250 μM) mit Darstellung der jeweils erhaltenen Ausgleichskurven nach Annahme eines Ping-Pong- (A) oder eines Ternärkomplex-Mechanismus (B). **C und D:** Experimente mit konstanten Succinyl-CoA- und variierten Benzoyl-CoA-Konzentrationen (\blacktriangle 50 μM , \blacksquare 100 μM , \blacktriangledown 250 μM) mit Darstellung der jeweils erhaltenen Ausgleichskurven nach Annahme eines Ping-Pong- (C) oder eines Ternärkomplex-Mechanismus (D). Die Qualität der Kurvenanpassungen wird durch die angegebenen R^2 -Werte angezeigt.

In der Sequenz von BbsB ist nur eines von zwei Cysteinen (Cys84) enthalten, die bei anderen Thiolasen üblicherweise konserviert sind und beim Reaktionsmechanismus eine wichtige Rolle spielen (Mathieu et al., 1997). Die Funktion dieses Cysteins besteht sehr wahrscheinlich in der kovalenten Bindung eines Acyl-Restes, durch die das „substituierte Enzym“-Intermediat des Ping-Pong-Mechanismus entsteht. In dieser Arbeit wurde in der kleinen Untereinheit BbsA 1 Zink-Ion/Monomer nachgewiesen, das vermutlich in Form des charakteristischen Zink-Finger-Motivs CxxC-X₁₀-CxxC innerhalb der „DUF35“-Domäne gebunden ist (B. Leuthner, 1999). Die Kristallstruktur eines hypothetischen Proteins aus *Sulfolobus solfataricus* (Acc.-Nummer: 2GNR_B) zeigt, dass dieses Protein wie BbsA als Dimer (α_2) vorliegt und ebenfalls 1 Zink-Ion pro Untereinheit in Form eines Zinkfinger-Motivs innerhalb der DUF35-Domäne gebunden hat (Joint Center For Structural Genomics, 2006). Das Zink-Ion in BbsA könnte daher die Funktion des fehlenden Cysteins in der großen Untereinheit BbsB übernehmen und in Anlehnung an konventionelle Thiolasen (Mathieu et al., 1997) kann für die Benzoylsuccinyl-CoA-Thiolase damit ein analoger molekularer Reaktionsmechanismus vorgeschlagen werden (Abb. 56). Im ersten Schritt greift die Thiolgruppe von Cys84 im aktiven Zentrum das C3-Atom von Benzoylsuccinyl-CoA nukleophil an und es wird eine C-S-Bindung gebildet (Abb. 56, 1). Im entstandenen Intermediat wird die Bindung zwischen C2 und C3 heterolytisch gelöst, so dass ein Benzoyl-Thioester am Cys84 entsteht (Abb. 56, 2). Diese Teilreaktion wird in konventionellen Thiolasen durch Abgabe eines Protons vom zweiten konservierten Cystein an das zwischenzeitlich freigesetzte Carbanion begünstigt. Da dieses Cystein in BbsB nicht konserviert ist, könnte diese Aufgabe durch die zweite Zink-Finger-haltige Untereinheit BbsA übernommen werden. Man könnte sich z. B. eine Bindung zwischen dem Zink-Ion und der Ketogruppe vorstellen, die den nukleophilen Angriff von Cys84 begünstigt, oder einen Ersatz der Protonen-Donator-Funktion durch gebundene Wasser-Moleküle am Zink-Ion (Abb. 56, 1). Als erstes Endprodukt der Reaktion wird dabei Succinyl-CoA gebildet und freigesetzt. Im folgendem wird ein freies CoASH-Molekül gebunden und vermutlich durch eines der beiden konservierten Histidine im aktiven Zentrum deprotoniert (Abb. 56, 2). Das so aktivierte CoA-Molekül greift das Benzoyl-Enzym-Intermediat nukleophil an und setzt es zu Benzoyl-CoA als zweitem Endprodukt der Reaktion um (Abb. 56, 3 und 4). Das Enzym steht anschließend wieder für einen neuen Katalysezyklus zur Verfügung. Bisher sind keine enzymatischen Reaktionen von Zink-haltigen Proteinen bekannt, die Zink-Ionen in Form eines Zink-Finger-Motivs gebunden haben. Daher sollen in Zukunft strukturelle und katalytische Eigenschaften durch Kristallisation des Proteins aufgeklärt werden.

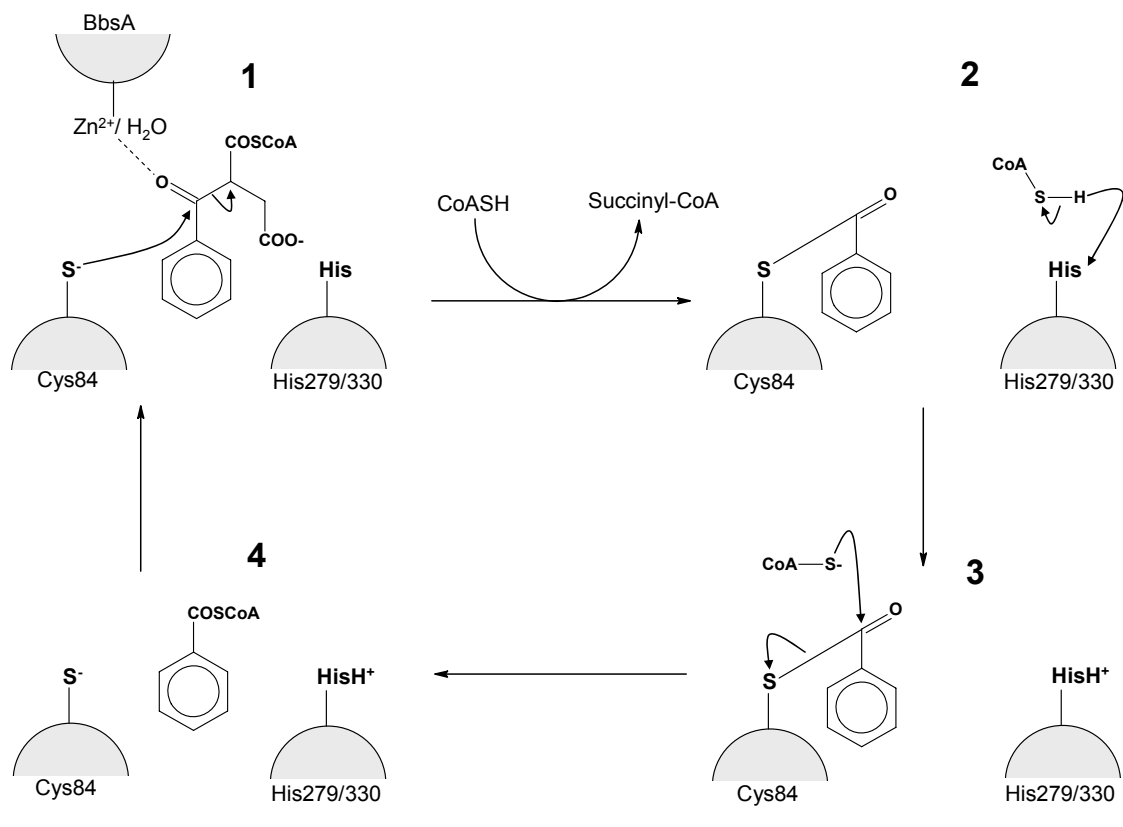


Abb. 56: Postulierter Reaktionsmechanismus der Benzoylsuccinyl-CoA-Thiolase. 1: Das C3-Atom des Substrates Benzoylsuccinyl-CoA wird von der Thiolgruppe des Cysteins C84 in BbsB nukleophil angegriffen. Die Spaltung der C2-C3-Doppelbindung im gebundenen Substrat wird vermutlich durch das Zn^{2+} -Ion in BbsA begünstigt. Dabei wird Succinyl-CoA freigesetzt und der Benzoyl-Thioester bleibt gebunden. 2: Durch einen konservierten Histidinrest im aktiven Zentrum von BbsB wird ein CoA-Molekül deprotoniert. 3: Das deprotonierte CoA greift das Benzoyl-Thioester-Intermediat nukleophil an. 4: Im letzten Schritt wird Benzoyl-CoA aus dem aktiven Zentrum freigesetzt und das Enzym steht für einen weiteren Reaktionszyklus zur Verfügung.

2. Die (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase

Die initiale Reaktion des anaeroben Toluolabbaus ist die Addition von Toluol an die Doppelbindung von Fumarat unter Bildung von (*R*)-Benzylsuccinat. Diese Reaktion wird von dem Enzym (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase katalysiert, das zur Familie der Glycylradikal-Enzyme gehört (Leuthner et al., 1998). Um das Enzym nach seiner Synthese in einen aktiven Zustand zu überführen, ist ein weiteres sogenanntes aktivierendes Enzym nötig, das posttranslational das Radikal in die (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase einführt.

In dieser Arbeit wurde die Anzucht von *T. aromatica* bzw. *Azoarcus* sp. Stamm T und die Präparation der Zellextrakte nach einem optimierten Verfahren durchgeführt, das die Messung der vollen Enzymaktivität beider (*R*)-Benzylsuccinat-Synthasen erlaubte (K. Verfürth, 2005). Die rekombinante (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase mit anfusioniertem Strep-Tag wurde in *E. coli* überproduziert, gereinigt und die Aktivierbarkeit des rekombinanten Enzyms durch das überproduzierte aktivierende Enzym überprüft. Des Weiteren wurden die Gene *bssCAB*, die für die (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase aus *G. metallireducens* kodieren, in einen Expressionsvektor kloniert.

2.1 Die (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase als Glycylradikalenzym

In den ersten Jahren der Untersuchungen zur (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase lag die gemessene spezifische Aktivität des Enzyms in Rohextrakten von *T. aromatica* bzw. *Azoarcus* sp. Stamm T zwischen 0,2 und 0,55 nmol min⁻¹ (mg Protein)⁻¹, was nur 1 bis 4 % der Umsatzrate entspricht, die für die gemessene Wachstumsrate auf Toluol nötig ist (C. Leutwein, 2000). Durch Optimierung der Anzucht- und Aufarbeitungsbedingungen wurden jedoch Enzymaktivitäten der (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase von 17 bis 23 nmol min⁻¹ (mg Protein)⁻¹ erreicht (Verfürth et al., 2004). In dieser Arbeit wurden vergleichbare Aktivitäten erhalten.

Die Enzyme aus *T. aromatica* und *Azoarcus* sp. Stamm T unterscheiden sich in ihren Substratspektren (Verfürth et al., 2004). Insbesondere setzt nur das Enzym aus Stamm T die drei Xylol-Isomere um, was mit der Fähigkeit zum Wachstum auf *m*-Xylol einhergeht, das von Stamm K172 nicht abgebaut wird (Verfürth et al., 2004; Krieger et al., 1999; Anders et al., 1995). Die Cresol-Isomere werden von den Enzymen beider Stämme umgesetzt, was mit

Berichten zum Abbau bzw. zur Biotransformation von *o*- oder *m*-Cresol durch verschiedene verwandte Stämme korreliert (K. Verfürth, 2005). In dieser Arbeit wurde in Rohextrakten von *T. aromatica* und *Azoarcus* sp. Stamm T zusätzlich die Umsetzung von *o*-Toluidin mit 9-13 % der Rate der Toluol-Umsetzung gemessen. Durch die Addition von Fumarat entsteht dabei vermutlich 2-Aminobenzylsuccinat, das in dieser Arbeit jedoch nicht über massenspektroskopische Methoden identifiziert werden konnte. *o*-Toluidin ist in Sprengstoffbelasteten Arealen in hohen Konzentrationen im Boden oder im Grundwasser zu finden. Über LC-MS bzw. LC-NMR-Analysen werden dort oft hohe Konzentrationen an Nitrophenolen, Nitrobenzylalkoholen (Preiss et al., 2007) und Di- bzw. Tetrahydrochinolinonen identifiziert (persönliche Mitteilung A. Preiss, MPI Hannover). Die Bildung der beobachteten Dihydrochinolinone kann deshalb nun durch die Umsetzung von 2-Aminobenzylsuccinat zu 2-Aminophenylitaconat (bzw. dessen CoA-Thioester) und anschließende Ausbildung einer Amidbindung erklärt werden (Abb. 57; persönliche Mitteilung A. Preiss, MPI Hannover). Bislang liegen keine Daten vor, ob einer der bekannten Toluol-abbauenden Stämme mit *o*-Toluidin als Substrat wächst oder ob die Umsetzung rein kometabolisch erfolgt.

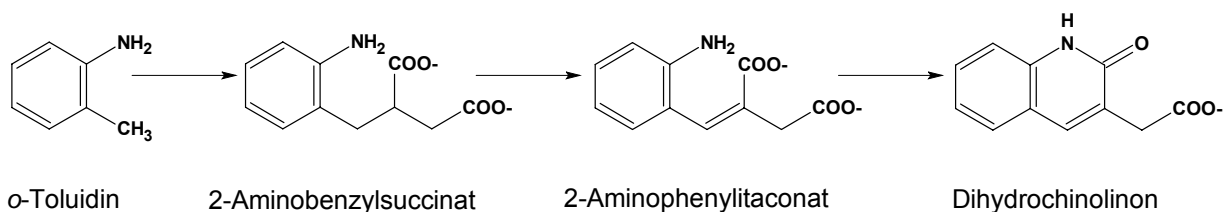


Abb. 57: Möglicher Abbau von *o*-Toluidin durch die (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase aus *T. aromatica* bzw. *Azoarcus* sp. Stamm T (nach A. Preiss, MPI Hannover). Durch Fumarataddition an die Methylgruppe von *o*-Toluidin entsteht 2-Aminobenzylsuccinat, das weiter zu 2-Aminophenylitaconat bzw. Dihydrochinolinon umgesetzt wird.

Anhand der unterschiedlichen Umsetzungsraten der Substratanaloga wird deutlich, dass die Spezifität der Substrat-Bindetaschen der (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase-Isoenzyme unterschiedlich ist. Dies scheint jedoch nicht die alleinige Voraussetzung für das Wachstum auf verschiedenen Substraten zu sein. Wahrscheinlich sind darüber hinaus auch die Spezifitäten der folgenden Enzyme der β -Oxidation zu den jeweiligen Benzylsuccinaten und regulatorische Effekte beteiligt (Leutwein und Heider 2002; Leutwein und Heider, 2001).

(*R*)-Benzylsuccinat-Synthase-ähnliche Enzyme, die Fumarat-Additionsreaktionen katalysieren, wurden in den letzten Jahren vermehrt in verschiedenen Mikroorganismen entdeckt. Dazu gehört Stamm HxN1, ein denitrifizierendes Betaproteobakterium, das auf *n*-Hexan als einziger Energie- und Kohlenstoffquelle wächst und den Kohlenwasserstoffabbau durch Fumarat-Addition an die subterminale Methylengruppe des *n*-Hexan initiiert (Rabus et al., 2001). Die Reaktion wird von einer 1-(Methylalkyl)-Succinat-Synthase katalysiert, einem Glycyl-Radikal-Enzym mit ähnlicher Untereinheitenstruktur wie die (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase (Grundmann et al., 2008). Die große Untereinheit MasD (97 kDa) ist zu 33,7 % identisch mit BssA, die beiden kleinen Untereinheiten MasE und MasC zeigen allerdings kaum Sequenzähnlichkeiten zu BssB und BssC (Grundmann et al., 2008). In MasD ist zudem ein konserviertes Sequenzmotiv um den katalytisch essentiellen Glycin-Rest enthalten (Grundmann et al., 2008; Becker et al., 1999). Aufgrund der ESR-spektroskopischen Detektion eines Glycyl-Radikalsignals in Rohextrakten von *n*-Hexan-abbauenden Zellen (Rabus et al., 2008; Rabus et al., 2001) kann MasD als katalytische Untereinheit des Enzyms angesehen werden. Als mögliches aktivierendes Enzym wurde MasG identifiziert, welches hohe Sequenzähnlichkeiten zu den Aktivasen der (*R*)-Benzylsuccinat-Synthasen und anderen SAM-Radikal-Enzymen aufweist (Grundmann et al., 2008). Des Weiteren wurde in einem marinen Sulfatreduzierenden Deltaproteobakterium beobachtet, dass der Abbau von 2-Methylnaphtalin möglicherweise über eine 2-(Naphthylmethyl)-Succinat-Synthase verläuft (Musat et al., 2008). Das Enzym besitzt eine α -Untereinheit mit 50 % Sequenzähnlichkeit zur der (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase, ist bisher aber nicht weiter charakterisiert worden (Musat et al., 2008). Zusammen mit weiteren ähnlichen Sequenzen aus Genomprojekten erweitert sich die Gruppe der gegenwärtig bekannten Fumarat-abhängigen (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase-ähnlichen Enzyme ständig und lässt sich mittlerweile in funktionelle phylogenetische Untergruppen einteilen (Abb. 58).

Da die (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase bisher zwar kristallisiert werden konnte, aber die erhaltene Auflösung nicht zur Strukturaufklärung ausreichte (C. Feil, 2006), wurden in dieser Arbeit zusätzlich die Gene eines orthologen, aber nur wenig verwandten Enzyms aus *G. metallireducens* mit Strep-Tag-Fusionsanteil in einen Expressionsvektor kloniert. Jedoch wurde keine Überproduktion rekombinanter (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase erreicht. Durch einen Austausch der ribosomalen Bindestelle vor dem *bssC* Gen wurden mittlerweile schon erste Erfolge bei der Überproduktion des Enzyms erzielt (persönliche Mitteilung M. Hilberg).

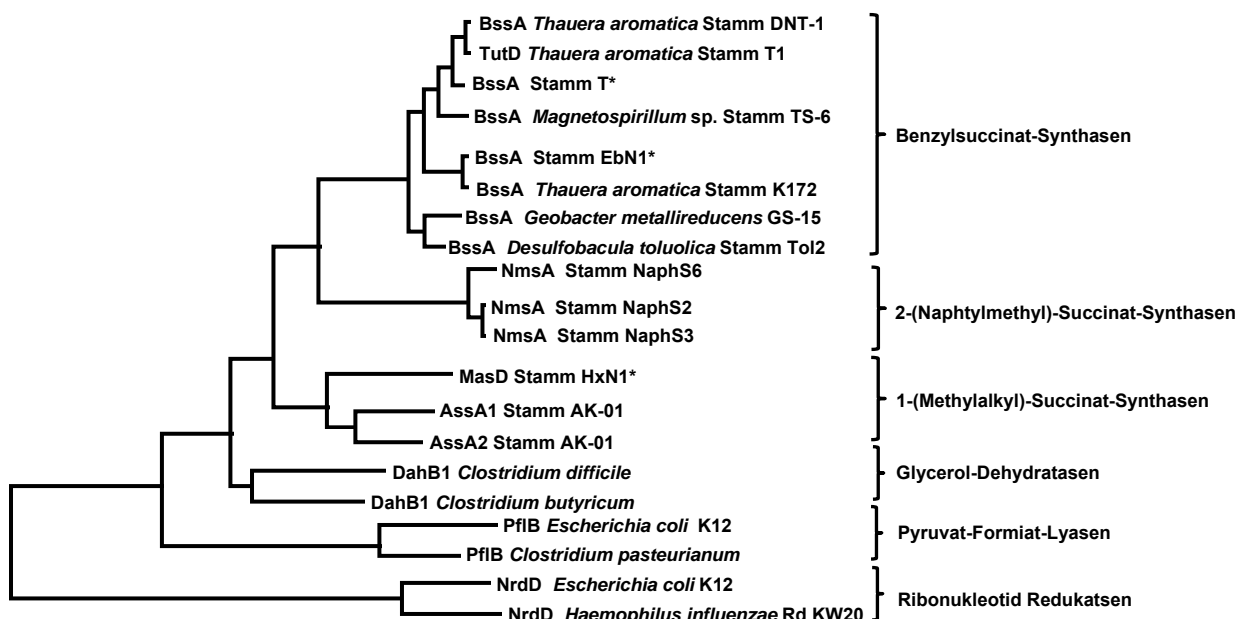


Abb. 58: Phylogenetischer Stammbaum von Glycylradikal-Enzymen aus verschiedenen Mikroorganismen (Grundmann et al., 2008). Bss: (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase, Tut: Ortholog zu Bss, Nms: 2-(Naphthylmethyl)-Succinat-Synthase, MasD/AssA: 1-(Methylalkyl)-Succinat-Synthase, Dah: Glycerol-Dehydratase, Pfl: Pyruvat-Formiat-Lyase, Nrd: Ribonukleotid-Reduktase. * Stämme T, HxN1 und EbN1 (früher: *Azoarcus*).

2.2 Aktivierung der rekombinanten (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase

Bisher war es nur möglich, die Enzymaktivität der (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase im Rohextrakt von Toluol-abbauenden *T. aromatica* zu bestimmen (siehe Diskussion 2.1; Verfürth et al., 2004; Leuthner et al., 1998). Sämtliche Reinigungsversuche der (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase und des aktivierenden Enzyms führten zu einem drastischen Verlust der Enzymaktivität (Verfürth et al., 2004; Leuthner et al., 1998). Daher wurde das nicht aktivierte Enzym mit anfusioniertem Strep-Tag in *E. coli* überproduziert, gereinigt und auf seine Aktivierbarkeit durch das aktivierende Enzym überprüft. Die gereinigte nicht aktivierte (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase enthielt alle drei Untereinheiten und stand somit als Substrat für die *in vitro*-Aktivierung zur Verfügung. Um eventuell weitere fehlende Kofaktoren zu ergänzen, wurden bei diesen Versuchen Rohextrakte von *T. aromatica* bzw. *Azoarcus* sp. Stamm T als Supplement eingesetzt, deren (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase-Aktivitäten zuvor durch Inkubation an Luft inaktiviert worden waren. Bei diesen Versuchen wurde allerdings weder über Messung der Produkte noch über Western Blot-Analyse der erwarteten Polypeptid-Spaltung an der Stelle des Glycyl-Radikals eine Aktivierung der (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase nachgewiesen. Mögliche Gründe für die fehlgeschlagenen

Aktivierungsversuche wären nicht korrekt assemblierte Fe-S-Zentren des aktivierenden Enzyms, Interferenz der Fusionsanteile der rekombinanten Aktivase oder eine fehlende native Konformation. Des Weiteren befinden sich im *bss*-Operon weitere Gene, deren Funktion bisher nicht bekannt sind und möglicherweise als Effektor-Proteine bei der Aktivierung der (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase eine wichtige Rolle spielen könnten (siehe Diskussion 2.4).

2.3 Das aktivierende Enzym

Das aktivierende Enzym aus *T. aromatica* liegt in Toluol-abbauenden Zellen nur in sehr geringen Konzentrationen vor und konnte bisher nicht aus Wildtyp-Zellen gereinigt werden (Leuthner et al., 1998). Zudem wurde das Enzym in ersten Versuchen zur rekombinanten Produktion stets in Form inaktiver Einschlusskörperchen (K. Hermuth, 2002; B. Leuthner, 1999) und erst vor kurzem als rekombinantes Fusionsprotein mit His-Tag und Thioredoxin zu etwa 3 % in löslicher Form erhalten (J. Hogg, 2008; C. Feil, 2006). In dieser Arbeit wurde die Löslichkeit dieses Fusionsproteins durch Optimierung der Überproduktionsbedingungen auf bis zu 10 % verbessert. Ein Grund für die schlechte Löslichkeit des Enzyms liegt vermutlich in der Komplexizität der vermuteten [Fe-S]-Motive des Proteins, die bei der Überproduktion in *E. coli* nicht oder nicht komplett assembliert werden. Vorangehende Versuche zur Solubilisierung der Einschlusskörperchen und Rekonstitution der [Fe-S]-Zentren wiesen darauf hin, dass die [Fe-S]-Zentren nicht richtig assembliert waren und das Protein instabil war (K. Verfürth, 2005). Aktuelle Überproduktionsversuche des aktivierenden Enzyms bei sehr tiefen Temperaturen in *E. coli* „Arctic Express“ (Novagen) ergaben allerdings mit diesem Konstrukt fast vollständig lösliches Fusionsprotein, das bereits im kleinen Maßstab über Affinitätschromatographie gereinigt werden konnte (persönliche Mitteilung M. Hilberg). Damit sollte es möglich sein, eine Reinigungsprozedur im größeren Maßstab zu etablieren und aktivierendes Enzym in ausreichenden Mengen zu reinigen und spektroskopisch und biochemisch zu charakterisieren. Von großem Interesse sind dabei vor allem ESR-Studien der vermuteten [Fe-S]-Zentren des Enzyms und ihre Reaktion auf Oxidation/Reduktion und die Bindung von SAM (Broderick et al., 2000; Broderick et al., 1997). Alle aktivierenden Enzyme besitzen einen hochkonservierten Bereich, in dem drei Cysteine liegen, die ein [Fe₄S₄]-Zentrum koordinieren (Sofia et al., 2001). Zusätzlich zu dieser konservierten Sequenz wurde im aktivierenden Enzym der (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase noch ein inseriertes Sequenzmotiv für eine [Fe₈S₈]-Ferredoxin-ähnliche Domäne gefunden, die sonst nur noch im

aktivierenden Enzym der *p*-Hydroxy-Phenylacetat-Decarboxylase enthalten ist (Selmer et al., 2005). Das $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Zentrum des aktivierenden Enzyms der Pyruvat-Formiat-Lyase wurde bereits intensiv mit spektroskopischen Methoden analysiert. Dabei wurden neben dem erwähnten $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Zentrum kuboidale und lineare $[\text{Fe}_3\text{S}_4]$ - und $[\text{Fe}_2\text{S}_2]$ -Zentren gefunden, allerdings immer in inaktiven Enzymfraktionen (Krebs et al., 2002). Man nimmt deshalb an, dass es sich bei diesen Formen des $[\text{Fe-S}]$ -Zentrums um Zerfallsprodukte des $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Clusters handelt. Die Labilität des $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Zentrums würde auch die hohe Instabilität des Enzyms erklären. Da das aktivierende Enzym der (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase vermutlich zusätzlich noch weitere $[\text{Fe-S}]$ -Zentren enthält, ist anzunehmen, dass das Enzym noch schwieriger handzuhaben ist als die bisher charakterisierten aktivierenden Enzyme.

2.4 Funktion weiterer Gene im *bss*-Operon

Stromabwärts des *bssB*-Gens befindet sich ein weiteres Gen, *bssE*, das gemeinsam mit den *bssDCAB*-Genen kotranskribiert wird (Hermuth et al., 2002). Dieses Gen kodiert für ein 32 kDa großes Protein, das eine ATP-Bindestelle besitzt (Walker-Motiv) und zur AAA^+ -Klasse der Chaperonähnlichen ATPasen gehört (Neuwald et al., 1999). Es konnte als Fusionsprotein mit N-Terminalem GST-Tag in Form von Einschlusskörperchen in *E. coli* überproduziert und anschließend rekonstituiert werden, zeigte aber bisher keine nachweisbare ATPase-Aktivität (J. Hogg, 2008). Eine verbesserte Löslichkeit des Proteins durch Variation verschiedener Parameter während der Überproduktion wurde in dieser Arbeit nicht beobachtet. Ein Knock-out-Experiment des orthologen Gens aus *T. aromatica* Stamm T1 zeigte, dass das Gen für das Wachstum auf Toluol essentiell ist (Bhandare et al., 2006). Datenbankanalysen zeigen Ähnlichkeiten von BssE zu den Genprodukten der *nirQ*- und *norQ*-Gene aus denitrifizierenden Bakterien sowie zum Genprodukt des *ccbQ*-Gens aus autotrophen Bakterien (Hayashi et al., 1999; Neuwald et al., 1999; Yokoyama et al., 1995; Jüngst und Zumft, 1992). Die beiden Proteine NirQ und NorQ sind für die Aktivität der Stickstoffmonoxid-Reduktase notwendig (Neuwald et al., 1999), während CbbQ an der posttranslationalen Aktivierung der Ribulose-1,5-Bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase beteiligt ist (Igarashi et al., 1999).

Stromabwärts des *bssE*-Gens wurden noch mindestens drei weitere Gene des *bss*-Operons identifiziert, nämlich *bssF* und *bssG*. Das *bssF*-Gen wurde in dieser Arbeit in einen

Expressionsvektor kloniert und in *E. coli* überproduziert. Die Löslichkeit des Fusionsproteins wurde jedoch nicht überprüft. In BssF wurde ein Sequenzmotiv von etwa 200 Aminosäuren detektiert, welches Ähnlichkeiten zur „von Willebrand-Faktor A“-Proteindomäne (vWA) aufweist, welche einer klassische a/b *para*-Rossmann Faltung enthält. Diese Domäne wurde erstmals im „von Willebrandfaktor A“ gefunden, einem Glycoprotein, das an der Blutgerinnung beteiligt ist (Sadler, 1998). Proteine mit einer vWA-Domäne sind Eukaryonten, Prokaryonten und Archaea zu finden und spielen eine wichtige Rolle bei vielen zellulären Funktionen, wie z.B. Zellwanderung, Zelldifferenzierung, Adhäsion (v. a. Integrine) und Transkription (Whittaker und Hynes, 2002). Einige vWA-Domänen sind an der Ausbildung von Protein-Komplexen beteiligt, die vermutlich durch eine sogenannte „metal ion-dependent adhesion sites“ (MIDAS) innerhalb der vWA-Domäne vermittelt wird (Craig et al., 2004; Whittaker und Hynes, 2002). Interessanterweise ist eine solche Domäne auch in dem Protein CbbO aus dem thermophilen Wasserstoff-Oxidierer *Hydrogenophilus thermoluteolus* enthalten. Das *cbbO*-Gen liegt direkt hinter dem Gen *cbbQ*, dessen Produkt Sequenzähnlichkeiten zu BssE aufweist. Eine Koexpression von *cbbQ* und *cbbO* mit den Genen für die Untereinheiten der Ribulose-1,5-bisphosphat Carboxylase/Oxygenase (*cbbLS*) führte im Vergleich zur separaten Expression von *cbbL* und *cbbS* zu einer zweifach erhöhten Carboxylierungsrate (Igarashi et al., 1997). Dies lässt auf eine ähnlich geartete Beteiligung von BssE und BssF bei der Assemblierung und/oder Aktivierung der (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase oder des aktivierenden Enzyms schließen. Für zukünftige Aktivierungsversuche sollten aufgrund der beiden detektierten Domänen in BssE und BssF weitere Supplemente, wie z. B. ATP oder Metall-Ionen, eingesetzt werden.

Orthologe der Gene *bssH* bzw. *bssG* wurden in den *bss*-Operons einiger anderer Toluolabbauender Stämme gefunden, jedoch konnte diesen beiden Genprodukten bisher keine Funktion zugeordnet werden. Das *bssG*-Genprodukt wurde als spezifisch induziertes Protein in Rohextrakten von auf Toluol gewachsenen Zellen detektiert (Kube et al., 2004), jedoch ist die Funktion des Genproduktes bis heute unbekannt. In dieser Arbeit wurde das *bssG*-Genprodukt in *E. coli* überproduziert, jedoch lag das Fusionsprotein ausschließlich in Form von Einschlusskörperchen vor. Das *bssH*-Genprodukt zeigt Ähnlichkeiten zu Mitgliedern der „major facilitator superfamily“ und der Bcr/CflA-Subfamilie und kodiert für ein membranständiges Transport-Protein (Rabus et al., 2003). Einige Mitglieder dieser Familien sind an der Aufnahme aromatischer Verbindungen beteiligt (Saier, 2000). Da Toluol membrangängig ist, könnte es sich hierbei auch um ein Efflux-System handeln, das toxische

Toluol-Konzentrationen entgiftet (Kube et al., 2004).

VI. Literaturverzeichnis

Altenschmidt U., Fuchs G. (1991). Anaerobic degradation of toluene in denitrifying *Pseudomonas* sp.: indication for toluene methyl-hydroxylation and benzoyl-CoA as central aromatic intermediate. *Archives of Microbiology*, Vol. 156: 152-158.

Amann E., Ochs B., Abel K. (1988). Tightly regulated tac promotor vectors useful for the expression of unfused and fused proteins in *Escherichia coli*. *Gene*, Vol. 69:301-315.

Anders H., Kaetzke A., Kampfer P., Ludwig W., Fuchs G. (1995). Taxonomic position of aromatic-degrading denitrifying pseudomonad strains K172 und KB740 and their description as new members of the genera *Thauera*, as *Thauera aromatica* sp. Nov., and *Azoarcus*, as *Azoarcus evansii* sp. Nov., respectively, members of the beta subclass of the Proteobacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Bacteriology*, Vol. 45: 327-333.

Andersson J., Westman M., Sahlin M., Sjöberg B. (2000). Cysteines involved in radical generation and catalysis of class III anaerobic ribonucleotide reductase. *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 275: 19449-19455.

Antonenkova V.D., Van Veldhoven P.P., Waelkens E., Mannaerts G.P. (1997). Substrate specificities of 3-oxoacyl-CoA thiolase A and sterol carrier protein 2/3-oxoacyl-CoA thiolase purified from normal rat liver peroxisomes. Sterol carrier protein 2/3-oxoacyl-CoA thiolase is involved in the metabolism of 2-methyl-branched fatty acids and bile acid intermediates. *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 272: 26023-26031.

Becker A., Fritz-Wolf K., Knappe J., Schulz S., Volker Wagner A. F. (1999). Structure and mechanism of the glycyl radical enzyme pyruvate formate-lyase. *Nature, Structural Biology*, Vol. 6: 969-975.

Begg Y., Wyte J., Haddock B. (1977). The identification of mutants of *Escherichia coli* deficient in formate dehydrogenase and nitrate reductase activities using dye indicator plates. *FEMS Microbiology Letters*, Vol. 2: 47-50.

Beller H. R., Edwards E. (2000). Anaerobic toluene activation by benzylsuccinate synthase in highly enriched methanogenic culture. *Applied Environmental Microbiology*, Vol. 66: 5503-5505.

Beller H. R., Spormann A. M. (1999). Substrate range of benzylsuccinate synthase from *Azoarcus* sp. Strain T. *FEMS Microbiology Letters*, Vol. 178: 147-153

Beller H., Spormann A., Sharma P., Cole J., Reinhard M. (1996). Isolation and Characterization of a Novel Toluene-Degrading, Sulfate-Reducing Bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 62: 1188-1196.

Beller H., Reinhard M., Grbic-Galic D. (1992). Metabolic By-Products of Anaerobic Toluene Degradation by Sulfate-Reducing Enrichment Cultures. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol: 58: 3192-3195.

Bhandare R., Calabro M., Coschigano P.W. (2006). Site-directed mutagenesis of the *Thauera aromatica* strain T1 tutE tutFDGH gene cluster. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol.: 346: 992-998.

Biegert T., Fuchs G., Heider J. (1996). Evidence that anaerobic oxidation of toluene in the denitrifying bacterium *Thauera aromatica* is initiated by formation of benzylsuccinate from toluene and fumarate. *European Journal of Biochemistry*, Vol. 238: 661-668.

Boll M., Fuchs G., Heider J. (2002). Anaerobic oxidation of aromatic compounds and hydrocarbons. *Current Opinion in Chemical Biology*, Vol. 6: 604-11.

Boll M., Fuchs G. (1995). Benzoyl-CoA reductase (dearomatizing), a key enzyme of anaerobic aromatic metabolism. ATP dependence of the reaction, purification and some properties of the enzyme from *Thauera aromatica* strain K172. *European Journal of Biochemistry*, Vol. 234: 921-33.

Bradford M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, Vol. 72: 248-254.

Broderick, J. B., Henshaw, T. F., Cheek, J., Wojtuszewski, K., Smith, S. R., Trojan, M. R., McGhan, R. M., Kopf, A., Kibbey, M., and Broderick, W.E. (2000). Pyruvate formate-lyase-activating enzyme: Strictly anaerobic isolation yields active enzyme containing a $[3\text{Fe-4S}]^+$ cluster. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol.: 269: 451-456.

Broderick, J. B., Duderstadt, R. E., Fernandez, D. C., Wojtuszewski, K., Henshaw, T. F., and Johnson, M. K. (1997). Pyruvate formate-lyase activating enzyme is an iron-sulfur protein. *Journal of the American Chemical Society*, Vol.: 119: 7396-7397.

Bun-Ya M., Maebuchi M., Togo S. H., Kurosawa T., Hashimoto T., Kamiryo T. (2000). Metabolic significance and expression of *Caenorhabditis elegans* type II 3-oxoacyl-CoA thiolase. *Cell Biochemistry and Biophysics*, Vol. 32: 291-293.

Chee-Sanford J. C., Frost J. W., Fries M. R., Zhou J., Tiedje J. M. (1996). Evidence for acetyl coenzyme A and cinnamoyl coenzyme A in anaerobic toluene mineralization pathway in *Azoarcus tolulyticus* Tol-4. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 62: 964-973.

Cornish-Bowden, A. (2004). Fundamentals of Enzyme Kinetics (3rd edn.), Portland Press, London.

Coshigano P. W., Wehrmann T. S., Young L. Y. (1998). Identification and analysis of genes involved in anaerobic toluene metabolism by strain T1: putative role of a glycine free radical. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 64: 1650-1656.

Craig D., Gao M., Schulten K., Vogel V. (2004). Structural insights into how the MIDAS ion stabilizes integrin binding to an RGD peptide under force. *Structure*, Vol. 12: 2049-2058.

Dagley S. (1984). Microbial degradation of aromatic compounds. *Developments in Industrial Microbiology*, Vol. 25: 53-56.

Dawson R., Elliot D., Elliot W., Kenneth M. (1986). Data for biochemical research, 3rd ed., Clarendon Press, Oxford: 124-125.

Decker, K. (1959). Die aktivierte Essigsäure. Das Coenzym A und seine Acylderivate im Stoffwechsel der Zelle. 1. Auflage, Enke, Stuttgart.

Dolfing J., Zeyer J., Binder-Eicher P., Schwarzenbach R. (1999). Isolation and characterization of a bacterium that mineralizes toluene in the absence of molecular oxygen. *Archives of Microbiology*, Vol. 154: 336-341.

Evans P., Ling W., Goldschmidt B., Ritter E., Young L. (1992). Metabolites Formed during Anaerobic Transformation of Toluene and *o*-Xylene and Their Proposed Relationship to the Initial Steps of Toluene Mineralization. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 58: 496-501.

Faber K. (2000). Biotransformations in organic chemistry. 4th ed., Springer-Verlag, Berlin.

Feil C. (2006). Biochemie des anaeroben Stoffwechsels von Toluol in *Thauera aromatica*. Doktorarbeit, Technische Universität Darmstadt.

Ferguson K. A. (1964). Starch-gel electrophoresis-application to the classification of pituitary proteins and polypeptide. *Metabolism*, Vol. 13: 985-1002.

Gibson, D.T. and Subramanian, V. (1984) Microbial degradation of aromatic hydrocarbons. *Microbial Degradation of Organic Compounds* ed. Gibson, D.T., Marcel Dekker Inc., New York.

Grbic-Galic D., Vogel T. (1987). Transformation of Toluene and Benzene by Mixed Methanogenic Cultures. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 53: 254-260.

Gottschalk G. (1998). Bacterial metabolism. 2nd ed., Springer-Verlag Berlin.

Grundmann O., Behrends A., Rabus R., Amann J., Halder T., Heider J., Widdel F. (2008). Genes encoding the candidate enzyme for anaerobic activation of *n*-alkanes in the denitrifying bacterium, strain HxN1. *Environmental Microbiology*, Vol. 10: 376-385.

Haarwood C. S., Burchhardt G., Herrmann H., Fuchs G. (1999). Anaerobic metabolism of aromatic compounds via the benzoyl-CoA pathway. *FEMS Microbiology Reviews*, Vol. 22: 439-458.

Haarwood C. S., Parales R. (1996). The β -ketoadipate pathway and the biology of self identity. *Annual Review of Microbiology*, Vol. 50: 553-590.

He X. Y., Yang S. Y. (1997). Glutamate-119 of the large alpha-subunit is the catalytic base in the hydration of 2-trans-enoyl-coenzyme A catalyzed by the multienzyme complex of fatty acid oxidation from *Escherichia coli*. *Biochemistry*, Vol. 36: 11044-11049.

Heider J. (2001). A new family of CoA-transferases. *FEBS Letters*, Vol. 509: 345-349.

Heider J., Spormann A., Beller H., Widdel F. (1999). Anaerobic bacterial metabolism of hydrocarbons. *FEMS Microbiology Reviews*, Vol. 22: 459-473.

Heinrich P. C., Holzer H (1975). Regulatory mechanisms of enzymes in carbohydrate metabolism. *Annals of nutrition and metabolism*, Vol. 18: 13-29.

Hermuth K., Leuthner B., Heider J. (2002). Operon structure and expression of the genes for benzylsuccinate synthase in *Thauera aromatica* strain 172. *Archives of Microbiology*, Vol. 177: 132-138.

Hermuth K. (2002). Untersuchungen zum anaeroben Abbau von Kohlenwasserstoffen in denitrifizierenden Bakterien. Doktorarbeit, Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg i. Br..

Hiltunen J. K., Qin Y. (2000). beta-oxidation-strategies for the metabolism of a wide variety of acyl-CoA esters. *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol. 1484: 117-128.

Höffken H., Duong M., Friedrich T., Breuer M., Hauer B., Reinhardt R., Rabus R., Heider J. (2006). Crystal Structure and Enzyme Kinetics of the (S)-Specific 1-Phenylethanol Dehydrogenase of the Denitrifying Bacterium Strain EbN1. *Biochemistry*, Vol. 45: 82-93.

Hofstein H., Feng Y., Anderson V., Tonge P. (1999). Role of Glutamate 144 and Glutamate 164 in the Catalytic Mechanism of Enoyl-CoA Hydratase. *Biochemistry*, Vol. 38: 9508-9516.

Hogg J. (2008). Untersuchungen zu den an der initialen Reaktion des anaeroben Toluolabbaus beteiligten Proteine aus *Thauera aromatica* und der Glycerindehydratase aus *Rhodospirillum rubrum*. Doktorarbeit, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i.Br..

Hummel W. (1997). New alcohol dehydrogenases for the synthesis of chiral compounds. *Biotechnology*, Vol. 58: 146-184.

Joint Center for Structural Genomics (2006). Crystal structure of a protein with unknown function from DUF35 family (13815350) from *Sulfolobus solfataricus* at 1.80 Å resolution. <http://kb.psi-structuralgenomics.org/KB/report1.jsp> vom 04.12.2008.

Jörnvall H., Persson B., Jeffrey J. (1987). Characteristica of alcohol/polyol dehydrogenase, *European Journal of Biochemistry*, Vol. 167: 195-201.

Jüttner F., Hentasch J. (1986). Anoxic hypolimnion is a significant source of biogenic toluene. *Nature*, Vol. 323: 797-798.

Knappe J., Neugebauer F., Blaschowski H., Gänzler M. (1984). Post-translational activation introduces a free radical into pyruvate formate-lyase. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, Vol. 81: 1332-1335.

Kniemeyer O., Heider J. (2001). (S)-1-phenylethanol dehydrogenase of *Azoarcus* sp. strain EbN1, an enzyme of anaerobic ethylbenzene catabolism. *Archives of Microbiology*, Vol. 176: 129-35.

Krebs C., Broderick W., Henshaw T., Broderick J., Huynh B. (2001). Coordination of Adenosylmethionine to a Unique Iron Site of the [4Fe-4S] of Pyruvate Formate-Lyase Activating Enzyme: A Mössbauer Spectroscopic Study. *Journal of the American Chemical Society*, Vol. 124: 912-913.

Krieger C. J., Beller H. R., Reinhard M., Spormann A. M. (1999). Initial Reactions in Anaerobic Oxidation of *m*-Xylene by the Denitrifying Bacterium *Azoarcus* sp. Strain T. *Journal of Bacteriology*, Vol. 181: 6403-6410.

Kube M., Heider J., Hufnagel P., Kühner S., Beck A., Reinhardt R., Rabus R. (2004). Genes involved in the anaerobic degradation of toluene in a denitrifying bacterium, strain EbN1. *Archives of Microbiology*, Vol. 181: 182-184.

Kunau W. H., Dommes V., Schulz H. (1995). beta-oxidation of fatty acids in mitochondria, peroxisomes, and bacteria: a century of continued progress. *Progress in Lipid Research*, Vol. 34: 267-342.

Laemmli U. (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature*, Vol. 227: 680-685.

Laempe D., Jahn M., Fuchs G. (1999). 6-Hydroxycyclohex-1-ene-carbonyl-CoA dehydrogenase and 6-oxocyclohex-1-ene-1-carbonyl-CoA hydrolase, enzymes of the benzoyl-CoA pathway of anaerobic aromatic metabolism in the dinitrifying bacterium *Thauera aromatica*. *European Journal of Biochemistry*, Vol. 263 (2): 420-429.

Laempe D., Eisenreich W., Bacher A., Fuchs G. (1998). Cyclohexa-1,5-diene-carbonyl-CoA hydratase [corrected], an enzyme involved in anaerobic metabolism of benzoyl-CoA in the denitrifying bacterium *Thauera aromatica*. *European Journal of Biochemistry*, Vol. 255 (3): 618-627.

Lee, B. U., Lee, K., Mendez, J. & Shimkets, L. J. (1995). A tactile sensory system of *Myxococcus xanthus* involves an extracellular NAD(P)(+)-containing protein. *Genes & Development*, Vol. 9: 2964-2973.

Leonidas D. D., Oikonomakos N. G, A. C. Papageorgiou A. C., Sotiroudis T. G. (1992). Kinetic properties of tetrameric glycogen phosphorylase b in solution and in the crystalline state. *Protein Science*, Vol. 1: 1123-1132.

Leuthner B., Heider J. (2000). Anaerobic Toluene Catabolism of *Thauera aromatica*: the *bbs* Operon Codes for Enzymes of β -Oxidation of the Intermediate Benzylsuccinate. *Journal of Bacteriology*, Vol. 182: 272-277.

Leuthner B. (1999). Molekularbiologische und biochemische Untersuchungen zum anaeroben Metabolismus von Toluol in dem denitrifizierenden Bakterium *Thauera aromatica*. Doktorarbeit, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i. Br..

Leuthner B., Leutwein C., Schulz H., Hörth P., Haehnel H., Schiltz E., Schägger H., Heider J. (1998). Biochemical and genetic characterisation of benzylsuccinate synthase from *Thauera aromatica*: a new glycyl-radical enzyme catalysing the first step in anaerobic toluene metabolism. *Molecular Microbiology*, Vol. 28: 615-628.

Leutwein C., Heider J. (2002). (R)-Benzylsuccinyl-CoA dehydrogenase of *Thauera aromatica*, an enzyme of the anaerobic toluene catabolic pathway. *Archives of Microbiology*, Vol. 178: 517-524.

Leutwein C., Heider J. (2001). Succinyl-CoA:(R)-benzylsuccinate-CoA-transferase: an enzyme of the anaerobic toluene catabolic pathway in denitrifying bacteria. *Journal of Bacteriology*, Vol. 183: 4288-4295.

Leutwein C. (2000). Biochemische Untersuchungen zum anaeroben Toluol-Stoffwechsel. Doktorarbeit, Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg i. Br..

Leutwein C., Heider J. (1999). Anaerobic toluene-catabolic pathway in denitrifying *Thauera aromatica*: activation and β -oxidation of the first intermediate (R)-(+)-benzylsuccinate. *Microbiology*, Vol. 145: 3265-3271.

Lovley D., Lonergan D. (1990). Anaerobic oxidation of toluene, phenol and *p*-cresol by the dissimilatory iron-reducing organism GS-15. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 56: 1858-1864.

Mathieu M., Modis Y., Zeelen J. .P, Engel C. K., Abagyan R. A., Ahlberg A., Rasmussen B., Lamzin V. S., Kunau W. H., Wierenga R. K. (1997). The 1.8 Å crystal structure of the dimeric peroxisomal 3-ketoacyl-CoA thiolase of *Saccharomyces cerevisiae*: implications for substrate binding and reaction mechanism. *Journal of Molecular Biology*, Vol. 273: 714-728.

Miller J. (1972). Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

Modis Y., Wierenga R. K. (2000). Crystallographic analysis of the reaction pathway of *Zoogloea ramigera* biosynthetic thiolase. *Journal of Molecular Biology*, Vol. 297: 1171-1182.

Modis Y., Wierenga R. K. (1999). A biosynthetic thiolase in complex with a reaction intermediate: the crystal structure provides new insights into the catalytic mechanism. *Structure*, Vol. 7: 1279-1290.

Morbidoni H. R., de Mendoza D., Cornan J. E. Jr. (1996). *Bacillus subtilis* carrier protein is encoded in a cluster of lipid biosynthesis genes. *Journal of Bacteriology*, Vol. 178: 4794-800.

Murray M., Thompson W. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*, Vol. 8: 4321-4325.

Musat F., Galushko A., Jacob J., Widdel F., Kube M., Reinhardt R., Wilkes H., Schink B., Rabus R. (2008). Anaerobic degradation of naphthalene and 2-methylnaphthalene by strains of marine sulfate-reducing bacteria. *Environmental Microbiology*, Vol. 11: 209-219.

Neuwald A., Aravind L., Spouge J., Koonin E. (1999). AAA⁺: a class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation and disassembly of protein complexes. *Genome Research*, Vol. 1: 27-43.

Pfenning N. (1978). *Rhodocyclus purpureus* gen. nov and sp. nov., a ring shaped, vitamin B 12-requiring member of the family *Rhodospirillaceae*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, Vol. 28: 283-288.

Preiss A, Elend M, Gerling S, Berger-Preiss E, Steinbach K. (2007). Identification of highly polar nitroaromatic compounds in leachate and ground water samples from a TNT-contaminated waste site by LC-MS, LC-NMR, and off-line NMR and MS investigations. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 389: 1979-1988.

Rabus R., Wilkes H., Behrends A., Armstroff A., Fischer T., Pierik A. J., Widdel F. (2001). Anaerobic initial reaction of *n*-alkanes in a denitrifying bacterium: Evidence for (1-methylpentyl)succinate as initial product and for involvement of an organic radical in *n*-hexane metabolism. *Journal of Bacteriology*, Vol. 183: 1707-1715.

Rabus R., Widdel F. (1995). Anaerobic degradation of ethylbenzene and other aromatic hydrocarbons by new denitrifying bacteria. *Archives of Microbiology*, Vol. 163: 96-103.

Ravina E., Caro Y., Masaguer C. F. (2002). Preparation of (*R*)-(-)- and (*S*)-(+)-3-hydroxymethyl-1-tetralone tosylates, key intermediates in the synthesis of new CNS drugs, via resolution of precursors. *Tetrahedron: Assymetry*, Vol. 14: 381-387.

Raynaud C., Sarcabel P., Meynaial-Salles I., Croux C., Soucaille P. (2003). Molecular characterization of the 1,3-propanediol (1,3-PD) operon of *Chlostridium butyricum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol. 100: 5010-5015.

Reid, M. F., Fewson, C. A. (1994). Molecular characterization of microbial alcohol dehydrogenases. *Critical Reviews in Microbiology*, Vol. 20: 13-56.

Riveros-Rosas H., Julian-Sanchez A., Villalobos-Molina R., Pardo J. P., Pina E. (2003). Diversity, taxonomy and evolution of medium-chain dehydrogenase/reductase superfamily. *European Journal of Biochemistry*, Vol. 270: 3309-34.

Sadler J. E. (1998). Biochemistry and genetics of von Willebrand factor. *Annual reviews of Biochemistry*, Vol. 67: 395-424.

Saier Jr. M. H. (2000). A functional-phylogenetic classification system for transmembrane solute transporters. *Micobiology and Molecular Biology Reviews*, Vol.: 64: 354-411.

Saiki R. K., Gelfand D. H., Stoffel S., Scharf S. J., Higuchi R., Horn G. T., Mullis K. B., Erlich H. A. (1988). Primer-directed amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, Vol. 239: 487-494.

Sambrook T., Frisch E., Maniatis J. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor New York.

Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, Vol. 74 (12): 5463-5467.

Saschenbrecker S., Bracher A., Rao K. V., Rao Vasudeva K., Rao Vasudeva B., Hartl F. U., Hayer-Hartl M (2007). Structure and Function of RbcX, an assembly Chaperone for Hexadimeric Rubisco. *Cell*, Vol. 129: 1189-1200.

Sawers G., Watson G. (1998). A glycyl radical solution: oxygen-dependent interconversion of pyruvate formate-lyase. *Molecular Microbiology*, Vol. 29: 945-954.

Schachter D., Taggart J. (1953). Benzoyl Coenzyme A and Hippurate Synthesis. *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 2: 925-934.

Schlegel H. (1992). *Allgemeine Mikrobiologie*. 7. Auflage. Thieme Verlag, Stuttgart.

Selmer T., Pierik A., Heider J. (2005). New glycyl radical enzymes catalysing key metabolic Steps in anaerobic bacteria. *Biological Chemistry*, Vol. 386: 981-988.

Selmer T., Andrei P. (2001). *p*-Hydroxyphenylacetate decarboxylase from *Clostridium difficile*. *European Journal of Biochemistry*, Vol. 268: 1363-172.

Seyfried B., Glod G., Schocher R., Tschech A., Zeyer J. (1994). Initial Reactions in the Anaerobic Oxidation of Toluene and *m*-Xylene by Denitrifying Bacteria. *Applied and Enviromental Microbiology*, Vol. 60: 4047-4052.

Smilda T., Kamminga A., Reinders P., Baron W., van Hylckama Vlieg J. E. T., Beintema J. J. (2001). Enzymic and Structural Studies on *Drosophila* Alcohol Dehydrogenase and Other Short-Chain Dehydrogenases/Reductases. *Journal of Molecular Evolution*, Vol. 52: 457-466.

Sofia H., Chen G., Hetzler B., Reyes-Spindola J., Miller N. (2001). Radical SAM, a novel protein superfamily linking unresolved Steps in familiar biosynthetic pathways with radical mechanisms: functional characterization using new analysis and information visualization methods. *Nucleic Acids Research*, Vol. 29: 1097-1106.

Stadtman E. R. (1957). Preparation and assay of acyl coenzyme A and other thiolesters; use of hydroxylamine. *Methods in Enzymology*, Vol. 3: 931-941.

Studier F., Moffat B. (1986). Use of the bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *Journal of Molecular Biology*, Vol. 189: 113-130.

Stumpp T., Wilms B., Altenbuchner J. (2000). Ein neues L-Rhamnose-induzierbares Expressionssystem für *Escherichia coli*. *BIOspektrum*, Vol. 6: 33-36.

Tschech A., Fuchs G. (1987). Anaerobic degradation of phenol by pure cultures of newly isolated denitrifying pseudomonas. *Archives of Microbiology*, Vol. 148: 213-217.

U.S. Public Health Service (1989). Toxicological profile for toluene. Agency for Toxic Substances and disease Registry, U.S. Public Health Service, Atlanta.

Verfürth K. (2005). Untersuchungen zur Reaktion der Benzylsuccinat Synthase, des ersten Enzyms des anaeroben Toluol-Stoffwechsels. Doktorarbeit, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i. Br..

Verfürth K., Pierik A., Leutwein C., Zorn S., Heider J. (2004). Substrate specificities and electron paramagnetic resonance properties of benzylsuccinate synthases in anaerobic toluene and *m*-xylene metabolism. *Archives of Microbiology* 181:155-162.

Vogel T., Grbic-Galic D. (1986). Incorporation of Oxygen from Water into Toluene and Benzene during Anaerobic Fermentative Transformation. *Applied and Environmental Microbiology* 52: 200-202.

Wackett L. P., Bruce N. C. (2000). Environmental biotechnology. Towards sustainability. *Current Opinion in Biotechnology*, Vol. 11: 229-31.

Walsby C., Hong W., Broderick W., Cheek J., Ortillo D., Broderick J., Hoffmann B. (2001). Electron-Nuclear Double Resonance Spectroscopic Evidence that *S*-Adenosylmethionine Binds in Contact with the Catalytically Active $[4\text{Fe-4S}]^+$ Cluster of Pyruvate Formate-Lyase Activating Enzyme. *Journal of the American Chemical Society*, Vol. 12: 3143-3151.

Wang Z. X., Tsuruta H., Honda Y., Tachi-iri Y., Wakabayashi K., Amemiya Y., Kihara H. (1989). Kinetic study on the dimer-tetramer interconversion of phosphorylase b by a stopped-flow X-ray scattering method. *Biophysical Chemistry*, Vol. 33 (2): 153-60.

Webster L. T., Mieyal J. J., Siddiqui U. A. (1974). Benzoyl and hydroxybenzoyl esters of coenzyme A. Ultraviolet characterization and reactions mechanisms, *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 249: 26412-2645.

Wenger L. M., Isaksen G. H. (2002). Control of hydrocarbon seepage intensity on level of biodegradation in sea bottom sediments. *Organic Geochemistry*, Vol. 33: 1277-1292.

Whittaker C. A., Hynes R. O. (2003). Distribution and Evolution of von Willebrand/Integrin A Domains: Widely Dispersed Domains with Roles in Cell Adhesion and Elsewhere. *Molecular Biology of the Cell*, Vol.: 3369-3387.

Widdel F., Kohring G., Mayer F. (1983). Studies on dissimilatory sulfate-reducing bacteria that decompose fatty acids. III. Charakterization of the filamentous gliding *Desulfonema limicola* gen. nov. sp. nov., and *Desulfonema magnum* sp. nov.. *Archives of Microbiology*, Vol. 134: 286-294.

Woodcock D., Crowther P., Doherty J., Jefferson S., DeCruz E., Noyer-Weidner M., Smith S., Michael M., Graham M. (1989). Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic Acid Research*, Vol. 17: 3469-3478.

Wycisk, A. (2008). Anaerober mikrobieller Abbau von Toluol: Enzyme der β -Oxidation. Diplomarbeit an der Technischen Universität Darmstadt.

Yamamoto I., Saiki T., Liu S.M., Ljungdahl L. G. (1983). Purification and properties of NADP-dependent formate dehydrogenase from *Clostridium thermoaceticum*, a tungsten-selenium-iron protein. *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 258: 1826-1832.

Zehr B., Sahl T., Hall R. (1989). A one-step, low background coomassie staining for polyacrylamide gel. *Analytical Biochemistry*, Vol. 182: 157-159.

Zengler K., Heider J., Rossello-Mora R., Widdel F. (1999). Phototrophic utilization of toluene under anoxic conditions by a new strain of *Blastochloris sulfovirdis*. *Archives of Microbiology*, Vol. 172: 204-212.

Zeyer J., Kuhn E., Schwarzenbach R. (1986). Rapid Microbial Mineralization of Toluene and 1,3-Dimethylbenzene in the Absence of Molecular Oxygen. *Applied and Environmental Microbiology* 52: 944-947.

Zylstra G., Gibson D. (1991). Aromatic hydrocarbon degradation: a molecular approach. *Setlow J. K. (ed.) Genetic Engineering*, Plenum Press, New York, 13:183-203.

VII. Abkürzungsverzeichnis

A	Absorption
Å	Angström
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
<i>bbs</i>	β-oxidation von (<i>R</i>)-Benzylsuccinat
bp	Basenpaare
BSA	bovine serum albumin
<i>bss</i>	(<i>R</i>)-Benzylsuccinat-Synthase
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad-Celsius
CoA/CoASH	Coenzym A
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
C-Terminal	Carboxyterminal
Da	Dalton
DEAE	Diethylaminoethyl
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
ε	Extinktionskoeffizient
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESR	Elektronenspinresonanz
FPLC	fast performance liquid chromatography
g	Gramm
GST	Glutathion-S-Transferase
HPLC	high pressure liquid chromatography
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
K_{is}	Substratinhibitionskonstante
K_m	Michaelis-Konstante

l	Liter
lac	Lactose
mAU	milli-absorbance unit
MCS	multiple cloning site
MES	2-(<i>N</i> -Morpholino)-Ethansulfonsäure
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
NAD(H)	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
<i>N</i>	Hill-Koeffizient
N-Terminal	Aminoterminal
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RP	reversed-phase
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
SAM	<i>S</i> -Adenosylmethionin
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tab.	Tabelle
TEMED	<i>N,N,N,N</i> -Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
v.a.	vor allem
UV/Vis	ultra violet/visible
V_{max}	Maximalgeschwindigkeit
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
[<i>x</i>]	Substratkonzentration
z.B.	zum Beispiel

VIII. Anhang

1. Identifikation von Reaktionsprodukten über HPLC-MS

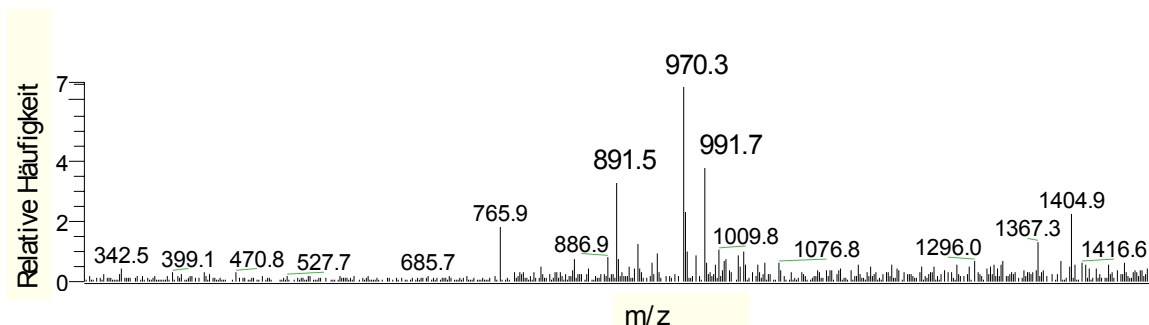


Abb. 59: Massenspektrum des Produktes der von gereinigter (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase katalysierten Reaktion. Der Reaktionsansatz enthielt gereinigte (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase (50 µg) und 500 µM (*E*)-Phenylitaconyl-CoA in 50 mM MES/NaOH (pH 6,2). Die Reaktion wurde nach 15 Minuten mit Säure gestoppt und nach Entfernen der Proteinfraction der Überstand mittels HPLC-MS analysiert. Das Produkt der enzymatischen Umsetzung zeigt eine Masse von 970,3 Da, die gut mit der erwarteten Masse von 972,7 Da von einfach deprotoniertem 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA übereinstimmt.

2. Produktnachweise über RP-HPLC (Kontrollexperimente)

Tab. 29 A und B: Kontrollexperimente zum Produktnachweis der von gereinigter 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA Dehydrogenase katalysierten Reaktion über RP-HPLC.

A: Der Standardansatz im gekoppelten Enzymtest enthielt gereinigte (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase (50 µg), gereinigte 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA Dehydrogenase (0,1 mg), 500 µM NAD und 500 µM (*E*)-Phenylitaconyl-CoA. **B:** Zum Nachweis einer Ketogruppe im Produkt der 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA Dehydrogenase-Reaktion enthielten die beschriebenen Standardansätze zusätzlich 750 µM Phenylhydrazin. In den Tabellen sind die Ansätze mit den jeweils fehlenden Komponenten des Standardansatzes gezeigt, die über RP-HPLC auf Produktbildung untersucht wurden

A: Kontrollexperimente zum Produktnachweis der von gereinigter 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA Dehydrogenase katalysierten Reaktion über RP-HPLC. -: kein Produkt mit einer Elutionszeit von 6-7 Minuten detektiert.

Fehlende Komponente(n) im Standardansatz
Produktpeak*(E)*-Phenylitaconyl-CoA

-

(E)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase

-

2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA Dehydrogenase

-

NAD

-

(E)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase und 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA Dehydrogenase

-

B: Kontrollexperimente zum Nachweis einer Ketogruppe im Produkt der 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA Dehydrogenase-Reaktion über RP-HPLC. -: kein Produkt mit einer Elutioszeit von 22 Minuten detektiert.

Fehlende Komponente(n) im Standardansatz	Produktpeak
(<i>E</i>)-Phenylitaconyl-CoA	-
(<i>E</i>)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase	-
2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA Dehydrogenase	-
NAD	-
(<i>E</i>)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase und 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA Dehydrogenase	-
Phenylhydrazin	-

Tab. 30 A und B: Kontrollexperimente zum Produktnachweis der von der Benzoylsuccinyl-CoA-Thiolase (BbsB und BbsA) katalysierten Reaktion über RP-HPLC. **A:** Der Standardansatz im enthielt 50 µg gereinigte Thiolase-Untereinheit BbsB, 50 µg BbsA und jeweils 250 µM Benzoyl-CoA und Succinyl-CoA. **B:** Zum Nachweis einer Ketogruppe im Produkt der von BbsA und BbsB katalysierten Reaktion enthielten die beschriebenen Standardansätze zusätzlich 750 µM Phenylhydrazin. In den Tabellen sind die Ansätze mit den jeweils fehlenden Komponenten des Standardansatzes gezeigt, die über RP-HPLC auf Produktbildung untersucht wurden.

A: Kontrollexperimente zum Produktnachweis der von der Benzoylsuccinyl-CoA-Thiolase (BbsB und BbsA) katalysierten Reaktion über RP-HPLC. -: kein Produkt mit einer Elutioszeit von 6-7 Minuten detektiert.

Fehlende Komponente(n) im Standardansatz	Produktpeak
BbsB	-
BbsA	-
BbsA und BbsB	-
Benzoyl-CoA	-
Succinyl-CoA	-
Benzoyl-CoA, Succinyl-CoA	-

B: Kontrollexperimente zum Nachweis einer Ketogruppe im Produkt der Benzoylsuccinyl-CoA-Thiolase-Reaktion über RP-HPLC. -: kein Produkt mit einer Elutioszeit von 22 Minuten detektiert.

Fehlende Komponente(n) im Standardansatz	Produktpeak
BbsB	-
BbsA	-
BbsA und BbsB	-
Benzoyl-CoA	-
Succinyl-CoA	-
Benzoyl-CoA, Succinyl-CoA	-
Phenylhydrazin	-

Tab. 31 A und B: Kontrollexperimente zur Umsetzung von Toluol und Fumarat durch die (R)-Benzylsuccinat-Synthase in Rohextrakten von auf Toluol (A) bzw. Benzoat (B) gewachsenen Zellen von *T. aromatica* bzw. *Azoarcus* sp. Stamm T. Der Standardansatz enthielt Zellextrakt von *T. aromatica* bzw. *Azoarcus* sp. Stamm T (35-45 mg ml⁻¹), 5 mM Toluol und 5 mM Natriumfumarat in 10 mM TEA/NaOH (pH 7,5). In den Tabellen sind die Ansätze mit den jeweils fehlenden Komponenten des Standardansatzes gezeigt, die über RP-HPLC auf Produktbildung untersucht wurden.

A: Kontrollexperimente zur Umsetzung von Toluol und Fumarat durch die (R)-Benzylsuccinat-Synthase in Rohextrakten von auf Toluol gewachsenen Zellen von *T. aromatica* bzw. *Azoarcus* sp. Stamm T. -: kein Produkt mit einer Elutioszeit von 6 Minuten detektiert.

Fehlende Komponente(n) im Standardansatz	Produktpeak <i>T. aromatica</i>	Produktpeak <i>Azoarcus</i> sp. Stamm T
Toluol	-	-
Fumarat	-	-
Toluol, Fumarat	-	-
Extrakt	-	-
Extrakt, Toluol	-	-
Extrakt, Fumarat	-	-

B: Kontrollexperimente zur Umsetzung von Toluol und Fumarat durch die (R)-Benzylsuccinat-Synthase in Rohextrakten von auf Benzoat gewachsenen Zellen von *T. aromatica* bzw. *Azoarcus* sp. Stamm T. -: kein Produkt mit einer Elutioszeit von 6 Minuten detektiert.

Fehlende Komponente(n) im Standardansatz	Produktpeak <i>T. aromatica</i>	Produktpeak <i>Azoarcus</i> sp. Stamm T
Toluol	-	-
Fumarat	-	-
Toluol, Fumarat	-	-
Extrakt	-	-
Extrakt, Toluol	-	-
Extrakt, Fumarat	-	-

Tab. 32 A und B: Kontrollexperimente zur Umsetzung von *o*-Toluidin und Fumarat durch die (R)-Benzylsuccinat-Synthase in Rohextrakten von auf Toluol (A) bzw. Benzoat (B) gewachsenen Zellen von *T. aromatica* bzw. *Azoarcus* sp. Stamm T. Der Standardansatz enthielt Zellextrakt von auf Toluol kultivierten Zellen von *T. aromatica* bzw. *Azoarcus* sp. Stamm T (35-45 mg ml⁻¹), 5 mM *o*-Toluidin und 5 mM Natriumfumarat in 10 mM TEA/NaOH (pH 7,5). In den Tabellen sind die Ansätze mit den jeweils fehlenden Komponenten des Standardansatzes gezeigt, die über RP-HPLC auf Produktbildung untersucht wurden.

A: Kontrollexperimente zur Umsetzung von *o*-Toluidin und Fumarat durch die (R)-Benzylsuccinat-Synthase in Rohextrakten von auf Toluol gewachsenen Zellen von *T. aromatica* bzw. *Azoarcus* sp. Stamm T. -: kein Produkt mit einer Elutioszeit von 8 Minuten detektiert.

Fehlende Komponente(n) im Standardansatz	Produktpeak <i>T. aromatica</i>	Produktpeak <i>Azoarcus</i> sp. Stamm T
<i>o</i> -Toluidin	-	-
Fumarat	-	-
<i>o</i> -Toluidin, Fumarat	-	-
Extrakt	-	-
Extrakt, <i>o</i> -Toluidin	-	-
Extrakt, Fumarat	-	-

B: Kontrollexperimente zur Umsetzung von *o*-Toluidin und Fumarat durch die (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase in Rohextrakten von auf Benzoat gewachsenen Zellen von *T. aromatica* bzw. *Azoarcus* sp. Stamm T. -: kein Produkt mit einer Elutioszeit von 8 Minuten detektiert.

Fehlende Komponente(n) im Standardansatz	Produktpeak <i>T. aromatica</i>	Produktpeak <i>Azoarcus</i> sp. Stamm T
<i>o</i> -Toluidin	-	-
Fumarat	-	-
<i>o</i> -Toluidin, Fumarat	-	-
Extrakt	-	-
Extrakt, <i>o</i> -Toluidin	-	-
Extrakt, Fumarat	-	-

3. Sequenzen der in dieser Arbeit konstruierten Plasmide

3.1 Sequenzierung pCR-Script-GeobssCAB (Ergebnisse 2.2)

Die Sequenzierung des Plasmides pCR-Script-*GeobssCAB* wurde mit dem T3-Primer bzw. T7-Primer (Tab. 3) durchgeführt.

3.1.1 pCR-Script-*bssCAB* Seq_for

Obere Sequenz: *bssCAB* aus *G. metallireducens*

Untere Sequenz: Plasmid pCR-Script-*GeobssCAB*

1
	GTANNNCGAC	GGCCNNTGAG	CGCGCGTAAT	ACNNCTCACT	ATAGNGCGAA
616GA..TCAAC	CATGCACATA	AAGGAGATTC
51	TTGGGTACCG	GGCCCCCCT	CGAGCTCAAC	CATGCACATA	AAGGAGATTC
			XhoI		RBS
666	GAAATGACCA	CTTGTAAGAA	TTGCTCATTC	TATTTTGCCG	TTCCTGAAAA
101	GAAATGACCA	CTTGTAAGAA	TTGCTCATTC	TNTTTTGCCG	TTCCTGAAAA
	> <i>bssC</i>				
716	TGCCGGGGAC	TTTGAAGCAG	GCAAAGGAGA	CTGCGTTATC	GAAAAGGAGG
151	TGCCGGGGAC	TTTGAAGCAG	GCAAAGGAGA	CTGCGTTATC	GAAAAGGAGG

766	ACGCAAAGGG	TAAATACTGG	CTGTCCAAGC	CGACCAGGAA	CGATTCTCCA
201	ACGCAAAGGG	TAAATACTGG	CTGTCCAAGC	CGACCAGGAA	CGATTCTCCA
816	TCATGTAAAG	CATTCAAAAC	AGCATAACAA	ATGATCAAAC	AGGGGGTTAT
251	TCATGTAAAG	CATTCAAAAC	AGCATAACAA	ATGATCAAAC	AGGGGGTTAT
866	TC.....ATGTCAAC	GGTTGCTGCA
301	TCATGTGGAG	CCACCCGCAG	TTCGAAAAGC	ATATGTCAAC	GGTTGCTGCA
	Strep-Tag		NdeI > bssA		
916	TCAATTAAGT	ACAATGACAA	GGTTGTTCGAT	TTTCCGCTGG	CAAATCAGGA
351	TCAATTAAGT	ACAATGACAA	GGTTGTTCGAT	TTTCCGCTGG	CAAATCAGGA
966	AGAAAATGCA	ATAGCTGATG	AAGTACTTCA	TGAAAATCTT	GCCCGTCCCA
401	AGAAAATGCA	ATAGCTGATG	AAGTACTTCA	TGAAAATCTT	GCCCGTCCCA
1061	CCACGGAGAG	GACAAAGAGA	CTCAAGGCAC	GGTGCCGCTG	GAAGCATGCC
451	CCACGGAGAG	GACAAAGAGA	CTCAAGGCAC	GGTGCCGCTG	GAAGCATGCC
1066	GCAGCGGGAG	AATTTGTCTGA	TGCGGAGGTT	CGGGCCGGCA	TCGAGCGGAT
501	GCAGCGGGAG	AATTTGTCTGA	TGCGGAGGTT	CGGGCCGGCA	TCGAGCGGAT
1116	GCGCTTCATC	ACCGAAGCGC	ACAAGGCGAG	CGCAGGGCAG	CCGGAAGTGA
551	GCGCTTCATC	ACCGAAGCGC	ACAAGGCGAG	CGCAGGGCAG	CCGGAAGTGA
1166	TCAGAAGAGC	GTTGGGACTC	GCGAACATAT	TGAACAAAAG	CACGCTGGTC
601	TCAGAAGAGC	GTTGGGACTC	GCGANNATAT	TGAACAAAAG	CACGCTGGTC
1216	CTGCAGCAGG	ACGAATTCAT	CATCGGCTAC	CACGCCGAAG	ACCCCGAGAT
651	CTGCAGCAGG	ACGAATTCAT	CATCGGCTAC	CACGCCGAAG	ACCCCGAGAT
1266	GTTTCCGCTC	TATCCTGAAC	TCGCCTATAT	GNCGGTTCAG	GACTIONCTCA
701	GTTTCCNCTC	TATCCTNAAC	TCGCNNNTAT	GGCNNNTCAG	GACTIONCTCA
1316	TGAGTGACTA
751	TNAGTNNNTA	CTCCCCCAG	CCCAAAGAAG	AAGCTGCGGA	GATCAACGAA

3.1.2 pCR-Script Amp SK(+)-*bssCAB* Seq_rev

Obere Sequenz: *bbsCAB* aus *G. metallireducens*

Untere Sequenz: Plasmid pCR-Script-*GeobssCAB*

	> bssA				
1781	GGACTCTACA	TGGAAATCGG	GTCACGGACC	GGTCCAACCC	CGGATGGCCC

1831 1	TTTCGGTGGCGGC	GATGCCGGTG GATGCCGNG	ACGACGGGGG ACGACGGGGG	TATTTCTCCC TATTTCTCCC	TACATGGGGA TACATGGGGA
1881 44	CGGACAAAAA CGGACAAAAA	AGGACCGACT AGGACCGACT	GCCGTACTGA GCCGTACTGA	AGTCCGTTTC AGTCCGTTTC	CAAAGTGCAG CAAAGTGCAG
1931 94	AAAAACCAGA AAAAACCAGA	AAGCCAATCT AAGCCAATCT	GCTCAACCAG GCTCAACCAG	AGGCTTTCCG AGGCTNTCCG	TGCCGATCAT TGCCGATCAT
1981 144	GCGTAGCGTG GCGTAGCGTG	CATGGTTTTTA CATGGTTTTTA	CTATCTGGAA CTATCTGGAA	ATCCTATATG ATCCTATATG	GATGCCTGGG GATGCCTGGG
2031 194	AGAAACTCAA AGAAACTCAA	CATAGATCAT CATAGATCAT	GTCCAGTTCA GTCCAGTTCA	ACTGCGTGAG ACTGCGTGAG	CACTGCAGAG CACTGCAGAG
2081 244	ATGAAGGCCG ATGAAGGCCG	CTCAAAAGGA CTCAANNNGA	ACCCGAAAAG ACCCGAAAAG	CATCAGGATC CATCAGGATC	TCATCGTCAG TCATCGTCAG
2131 294	GGTTTCAGGC GGTTTCAGGC	TTCAGTGCCC TTCAGTGCCC	GCTTTGTGGA GCTTTGTGGA	TATCCCGACC TATCNNGACC	TATGGCCAAA TATGGCCAAA
2181 344	ACACCATCAT ACACCATCAT	CGCCAGAAAC CGCCAGAAAC	GAACAGGCCT GAACAGGCCT	TCGGTGCCGA TCGGTGCCGA	TGATCTTGAA TGATCTTGAA
2231 394	TACCTGAACA TACCTGAACA	CACAACTCTA CACAACTCTA	ACAAATACAT ACAAATACAT	CCACGTGGGG CCACGTGGGG	GCATTCCCGG GCATTCCCGG
2281 444	CGGGATGTCT CGGGATGTCT	CCACGTGGCC CCACGTGGCC	CGGGACAGGA CGGGACAGGA	GGCAACAGTG GGCAACAGTG	AGCGCAACAA AGCGCAACAA
	> <i>bssB</i>				
2331 494	GTAATGGCAA GTAATGGCAA	CATGATGCAC CATGATGCAC	GAAGAGCCTG GAAGANNCTG	GCACGAAGAA GCACGAAGAA	ACCGTGTCAA ACCGTGTCAA
2381 544	TCATGCAAAT TCATGCAAAT	GGCAGATAGC GGCAGATAGC	GGACCCCACC GGACCCCACC	AACCCGCTTC AACCCGCTTC	GGGGACAGTG GGGGACAGTG
2431 594	CACCGTCAAC CACCGTCAAC	AGAAATGCCA AGANATGCCA	TGGGTGGCGT TGGGTGGCGT	GTGGAAACGG GTGGNAACGG	TGGGTAACCG TGGGTAACCG
2481 644	ACGTAAACAG ACGTAAACAG	GATGACCTGC GATGACCTGC	GGCAAACATG GGCAAACATG	AAGTCGGCAA AAGTCGGCAA	GCTCAGCTTC GCTCAGCTTC
2531 694	AGAGAACATG AGAGAACATG	TGTGA..... TGTGATACTG GATCCGCCCC GGCTAGAGCG GCCGCCACCG
			BamHI		

3.2 Sequenzierung pJOE2775-*bssF* (Ergebnisse 2.5.3)

Die Sequenzierung des Plasmides pJOE2775-*bssF* wurde mit dem Primer Seq_pJOE2775_for (Tab.3) durchgeführt.

3.2.1 pJOE2775-*bssF* Seq_for

Obere Sequenz: Plasmid pJOE2775-*bssF*

Untere Sequenz: *bssF* aus *T. aromatica*

			<i>NdeI</i>		
1	AANTCNNAAG	AAGGAGATAT	ACATATGCCC	CCGGCTCCCG	CCACGCCCCT
1ATGCCC	CCGGCTCCCG	CCACGCCCCT
			> <i>bssF</i>		
51	CATCGAACGC	TTCGTCATTC	CCGACGCCGA	CGGTTATTCC	GAGTTCCTGGC
27	CATCGAACGC	TTCGTCATTC	CCGACGCCGA	CGGTTATTCC	GAGTTCCTGGC
101	GCCGCGACAA	GTCGCCGGTC	GAACCGCTCG	AGCTCGCGAA	GCTGCTGCAC
77	GCCGCGACAA	GTCGCCGGTC	GAACCGCTCG	AGCTCGCGAA	GCTGCTGCAC
151	GCGCTGCGCA	AGGTCGCCGC	ATTCGTCGGT	CGCAATGCGG	GCGAGGTCGT
127	GCGCTGCGCA	AGGTCGCCGC	ATTCGTCGGT	CGCAATGCGG	GCGAGGTCGT
201	GTGGTCCGGC	ATGGCACAGG	ACGACGCCAC	GATCGCGATC	GATCCGTCAC
177	GTGGTCCGGC	ATGGCACAGG	ACGACGCCAC	GATCGCGATC	GATCCGTCAC
251	CGATCCTCGG	CTGCTACCCG	GTGCCGGCGG	CGCGCACCAG	CCTGGTGGTC
227	CGATCCTCGG	CTGCTACCCG	GTGCCGGCGG	CGCGCACCAG	CCTGGTGGTC
301	GGGCTGACCG	TCCACCAGGC	CTATCTGCGC	ACAGAATGGA	GCGCGCGCGT
277	GGGCTGACCG	TCCACCAGGC	CTATCTGCGC	ACAGAATGGA	GCGCGCGCGT
351	GCGCGAGCTC	GCCCTCGCCC	GCCTCCAGCC	TCCGCCGCAA	TACGCATACA
327	GCGCGAGCTC	GCCCTCGCCC	GCCTCCAGCC	TCCGCCGCAA	TACGCATACA
401	AGTTCGGGCT	GTTCCCTCGAC	CTGTGCGAGA	GCGTCTACGT	CGACAACCTC
377	AGTTCGGGCT	GTTCCCTCGAC	CTGTGCGAGA	GCGTCTACGT	CGACAACCTC
451	GCGAACCGCA	GCGTGCTCGG	ACACTACGCG	GAAATCGCCC	GGCGCTGGCG
427	GCGAACCGCA	GCGTGCTCGG	ACACTACGCG	GAAATCGCCC	GGCGCTGGCG
501	CGTCGAGAAC	AATGCGCGCC	GGCTGCTGTC	GCCGCCGACG	CTGTCCGAGG
477	CGTCGAGAAC	AATGCGCGCC	GGCTGCTGTC	GCCGCCGACG	CTGTCCGAGG
551	TGCTGCACCT	GTGGTGGGTC	TTCGCCACCG	ACCGCGACCC	GGATCGCTAC
527	TGCTGCACCT	GTGGTGGGTC	TTCGCCACCG	ACCGCGACCC	GGATCGCTAC

601	CGGACGCGAT	GGCTCGATCC	GTGGCTCGAG	GACCTGCTCG	ATCGCGCCGC
577	CGGACGCGAT	GGCTCGATCC	GTGGCTCGAG	GACCTGCTCG	ATCGCGCCGC
651	ATTCGACAAG	TTCTATCAGG	CGCCCTTCGA	GCAGCTTGCG	ACTCTCGTCC
627	ATTCGACAAG	TTCTATCAGG	CGCCCTTCGA	GCAGCTTGCG	ACTCTCGTCC
701	CGGCGCTNNG	CANGCAGNGC	CCGGNN....
677	CGGCGCTGCG	CACGCAGTGC	CCGGCGATCA	CCGGCATCGC	CGAACGCGTC
727
	GAGTTCCGCG	TCGAGCACTA	CCTGGCCCTG	TGGAAGACCC	TGCTGCCGCG

3.3 Sequenzierung pTrc99A-*bbsAB* (Ergebnisse 1.5)

Das in dieser Arbeit verwendete Plasmid pTrc99A-*bbsAB* (K. Hermuth, 2002) wurde mit dem Primer Seq_pTrc99A_for bzw. Seq_pTrc99A_rev (Tab.3) sequenziert.

3.3.1 pTrc99A-*bbsAB* Seq_for

Obere Sequenz: Plasmid pTrc99A-*bbsAB*

Untere Sequenz: *bssAB* aus *T. aromatica*

3	GNCANNNATT	CTNAAATNAG	CTGNTGACAA	TTANNNNTCC	GGCTCGNNTA

53	ATGTGTGGAA	TTGTNAGCGG	ATAACAATTT	CACACAGGAA	ACAGACCATG
1
					<i>NcoI</i>
					<u>ATG</u>
					> <i>bbsA</i>
	> AS-Austausch: Alanin-Serin				
103	GCAGAGCAAA	AACCGAACAA	GAAGCCGGAA	AAGAAGCCGG	ATATCACGTT
4	TCAGAGCAAA	AACCGAACAA	GAAGCCGGAA	AAGAAGCCGG	ATATCACGTT
153	CTTCCACCCG	GATCTTCTCG	AGGCGCCCGC	CGACGGCCGC	GCGCCCTATC
54	CTTCCACCCG	GATCTTCTCG	AGGCGCCCGC	CGACGGCCGC	GCGCCCTATC
203	TCAAGGGCTA	CCGCTGCAAG	AAATGCGGGC	AGCTGGATTT	CCCCAACTG
104	TCAAGGGCTA	CCGCTGCAAG	AAATGCGGGC	AGCTGGATTT	CCCCAACTG
253	AGCCCGTGCC	CGAGCTGCTG	GGGCGAGGAG	TTCGAGGTCG	TGCCGCTCAG
154	AGCCCGTGCC	CGAGCTGCTG	GGGCGAGGAG	TTCGAGGTCG	TGCCGCTCAG

303	CCGCCGCGGC	AAGCTCTACA	GCTTCAGCGA	CAACTTCATC	GGCCAGGCGG
204	CCGCCGCGGC	AAGCTCTACA	GCTTCAGCGA	CAACTTCATC	GGCCAGGCGG
353	GAATGAAGAC	TCCCTATTCC	TTCGGCTATA	TCGACCTGCC	CGAGAATCTG
254	GAATGAAGAC	TCCCTATTCC	TTCGGCTATA	TCGACCTGCC	CGAGAATCTG
403	CGGATCTTCG	CCCAGCTCGA	AGGCGCGCCG	GGCAGCTTCC	GCTGCGACGA
304	CGGATCTTCG	CCCAGCTCGA	AGGCGCGCCG	GGCAGCTTCC	GCTGCGACGA
453	CGAGGTCGAG	TTGACGGTCG	GGACGGTGCG	CGACAACCGC	GACGGTGTGC
354	CGAGGTCGAG	TTGACGGTCG	GGACGGTGCG	CGACAACCGC	GACGGTGTGC
503	CGCTGATCAG	CTACAAGTTC	CGCAAGATCT	<u>AAT</u> CCTCGGT	GAGTGACGAC
404	CGCTGATCAG	CTACAAGTTC	CGCAAGATCT	AATCCTCGGT	GAGTGACGAC
553	<u>AAAT</u> GAAACT	GGAGCGCAAG	GTCTATATCG	CCGGGGTCGG	CGAGACGAAA
454	AAATGAAACT	GGAGCGCAAG	GTCTATATCG	CCGGGGTCGG	CGAGACGAAA
	>bbsB				
603	TTCGGTCGGC	ATGAAGTCGA	TTTCGACGTG	CTGGGTCGGG	CGGCGGCACT
504	TTCGGTCGGC	ATGAAGTCGA	TTTCGACGTG	CTGGGTCGGG	CGGCGGCACT
653	GGAGGCGTTG	AAGGCGTCGA	ACNNCNACNG	TNCGANNNTG	GTNNAG....
554	GGAGGCGTTG	AAGGCGTCGA	ACATCGACCG	TCCGACGATG	GTGCAGAGCG
703
604	CCTATGTCGG	CAACGGCACC	AACGGCATGG	TCACCGGGCA	GACCGTGCTC

3.3.2 pTrc99A-*bbsAB* Seq_rev

Obere Sequenz: Plasmid pTrc99A-*bbsAB*

Untere Sequenz: *bssB* aus *T. aromatica*

		<i>bbsB</i>			
25CGCT	ACCGCCGAGG	ATCTGGCGAT	GATCACGGTG
449	ACATGTACGA	GACCGGCGCT	ACCGCCGAGG	ATCTGGCGAT	GATCACGGTG
75	AAGAACCGCC	GCCACGCCAC	CAACAACCCC	TATGCCTGGT	TCAAGGGCGA
499	AAGAACCGCC	GCCACGCCAC	CAACAACCCC	TATGCCTGGT	TCAAGGGCGA
125	GATCTCGATC	GAGGAGGTGG	TGAATTTCGCG	CGTCGTCGCC	TCGCCGCTGA
549	GATCTCGATC	GAGGAGGTGG	TGAATTTCGCG	CGTCGTCGCC	TCGCCGCTGA

175	CGCTGCAGCA	GTGCTGCGGC	ATCGCCGACG	GTGCCGGCGC	GGTCGTGGTG
599	CGCTGCAGCA	GTGCTGCGGC	ATCGCCGACG	GTGCCGGCGC	GGTCGTGGTG
225	TGCTCGGAAG	AGATGGTGAA	GAAGCTCGGC	ATCAAGAAGC	CGATCCGGGT
649	TGCTCGGAAG	AGATGGTGAA	GAAGCTCGGC	ATCAAGAAGC	CGATCCGGGT
275	CGCCGGCTCG	GTCGTGCGCT	CGGGGCCGTA	CCACAACCGT	CCGCGTGACA
699	CGCCGGCTCG	GTCGTGCGCT	CGGGGCCGTA	CCACAACCGT	CCGCGTGACA
325	TCACCGGCGA	CGACATCACC	GAGGAGACCG	CGCATCAGCT	CTACGAGGAG
749	TCACCGGCGA	CGACATCACC	GAGGAGACCG	CGCATCAGCT	CTACGAGGAG
375	TCGGGCATCG	GCCCCGAGGA	CGTGAATATC	GTCGAACTGC	ACGATGCCTT
799	TCGGGCATCG	GCCCCGAGGA	CGTGAATATC	GTCGAACTGC	ACGATGCCTT
425	CACGATCGCC	GAAGTGCTGT	ACTACGAATG	CCTCGGCCTG	TGTCCGAAAG
849	CACGATCGCC	GAAGTGCTGT	ACTACGAATG	CCTCGGCCTG	TGTCCGAAAG
475	GCGAGGGGCT	CAAGTTCCTG	CGCGACGGCA	ACGCGACCCA	CGGCGGCAAA
899	GCGAGGGGCT	CAAGTTCCTG	CGCGACGGCA	ACGCGACCCA	CGGCGGCAAA
525	TGCGTCGTCA	GCCCGCGCGG	CGGCATGCTG	TCGTACGGCC	ATCCGATCGG
949	TGCGTCGTCA	GCCCGCGCGG	CGGCATGCTG	TCGTACGGCC	ATCCGATCGG
575	CGCTTCGGGC	GCGGCGCAGA	TTGCCGCCAG	CGTCAAGCAG	ATGCGCAACC
999	CGCTTCGGGC	GCGGCGCAGA	TTGCCGCCAG	CGTCAAGCAG	ATGCGCAACC
625	AGTGCCCCGG	CTACCAGGTC	GAGCCGGTGC	CGCGGGTGGC	GATGACGCAC
1049	AGTGCCCCGG	CTACCAGGTC	GAGCCGGTGC	CGCGGGTGGC	GATGACGCAC
675	GTGACCGGCG	GCGGCTGTCT	GGCACGGAAC	ACGCGGCATG	CACGATGCAC
1099	GTGACCGGCG	GCGGCTGTCT	GGCACGGAAC	ACGCGGCATG	CACGATGCAC
725	ATGCTGGTAA	GCGACTGGTA	<i>Bam</i> HI <u>AGGATCCTCT</u>	AGAGTCGACC	TGCAGGCATG
1149	ATGCTGGTAA	GCGACTGGTA	A.....

Danksagung

Mein großer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Johann Heider. Ich danke Dir für die Aufnahme in Deine Arbeitsgruppe, die Bereitstellung des interessanten Themas, für die Geduld und die wertvollen Ratschläge, die entscheidend für diese Arbeit beigetragen haben. Außerdem möchte ich Dir für die Knüpfung von Kontakten zu anderen Wissenschaftlern und die Möglichkeit, an verschiedenen wissenschaftlichen Tagungen teilzunehmen, danken.

Bei Prof. Dr. Felicitas Pfeifer bedanke ich mich für die unkomplizierte Übernahme des Koreferates. Des Weiteren danke ich Ihnen und Ihrer Arbeitsgruppe für die prima Nachbarschaft und ständige Unterstützung während der Darmstädter Zeit.

An Dr. Karola Schühle geht ein riesengroßes Dankeschön für die unermüdliche Unterstützung, den entgegengebrachten Optimismus und natürlich der vielen „Tea-Time-Schnatter-Minuten“ zur kurzen Ablenkung vom Laboralltag. Bei Tamara Heß, der einzigartigen „guten Fee“ im Darmstädter Labor, bedanke ich mich für die großartige Unterstützung.

Herrn PD Dr. Arnulf Kletzin und seiner Arbeitsgruppe danke ich für die ständige Hilfsbereitschaft. Besonders bei Andreas „Andilette“ Veith bedanke ich mich für die aufmunternden Gespräche, vor allem die nach den unzählig vielen gescheiterten HPLC-Läufen.

Bei allen ehemaligen Großpraktikanten, F-Praktikanten und Diplomanden bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit. Vor allem Diana Kathrey danke ich sehr für die Unterstützung außerhalb des Labors und die entstandene Freundschaft.

Mein herzlichster Dank gilt meiner Mutter, meiner Schwester Kathi, meinem Bruder Peter und meinem Freund Christoph für unser hervorragendes Verhältnis und den Zusammenhalt auch in schweren Zeiten, ohne den mein Studium und vor allem diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Ihr habt einiges mit mir aushalten müssen, wenn der Stress und die Belastung mal wieder groß waren. Aber ihr habt mich immer wieder abgelenkt und aufgebaut. DANKE!!!

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.

(Datum)

(Unterschrift)

Lebenslauf

Name: Marie-Luise Lippert
Geburtsdatum: 31.10.1979
Geburtsort: Groß-Umstadt
Familienstand: ledig

Schulbildung

08/1985 - 07/1989 Grundschule, Babenhausen
08/1989 - 07/1995 Gesamtschule, Babenhausen
07/1995 - 06/1998 Berufliches Gymnasium, Dieburg
06/1998 Abitur

Hochschulbildung

09/1998 - 09/1999 Studiengang Chemische Technologie,
Fachhochschule Darmstadt
10/1999 - 06/2004 Studiengang Biologie,
Technische Universität Darmstadt Prüfungsfächer:
Biochemie, Mikrobiologie, Zell- und Entwicklungsbiologie
07/2004 - 03/2005 Diplomarbeit am Department Biologie I, Mikrobiologie der
Ludwig-Maximilians-Universität München unter der
Leitung von Prof. Dr. Kirsten Jung zum Thema: „Zum
Einfluss der Usp-Domäne auf die Funktionalität der
Sensorkinase KdpD aus *Escherichia coli* unter
verschiedenen Stressbedingungen“

Promotion

07/2005 – 08/2008 Technische Universität Darmstadt, Institut für
Mikrobiologie und Genetik, unter der Leitung von Prof. Dr.
Johann Heider zum Thema: „Biochemie von Enzymen des
anaeroben Stoffwechsels von Toluol in *Thauera aromatica*“

